

Funktionalisierte Polymeroberflächen für die Photodynamische Inaktivierung (PDI) von Mikroorganismen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Physik
Spezialisierung: Experimentalphysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
M. Sc. Alexander Müller

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. rer. nat. Beate Röder
2. Prof. Dr. rer. nat. Oliver Benson
3. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Bäuml

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2021

für Viktoria und Nikita

Kurzzusammenfassung

Die Ausbreitung antimikrobieller Resistenzen, insbesondere Antibiotikaresistenzen, stellt ein zunehmendes gesundheitliches und gesellschaftliches Risiko dar. Alternative Verfahren für antimikrobielle Therapien oder zur Prophylaxe mit dem Anspruch eines geringen Resistenzpotenzials, breiten Wirkspektrums und geringen Risikos für Mensch und Umwelt gewinnen stetig an Bedeutung. Ein solches Verfahren stellt die Photodynamische Inaktivierung (PDI) dar. Ihr Wirkmechanismus beruht auf der photosensibilisierten Anregung reaktiver Sauerstoffspezies, vorzugsweise Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), die durch oxidativen Stress zum Zelltod führen. Das für die katalytische Aktivierung des Sauerstoffs verantwortliche Molekül, der Photosensibilisator (PS), muss nicht in die Mikroorganismen eindringen und wird durch sichtbares Licht angeregt. Die Übertragung einer stationär vermittelten PDI auf Oberflächen, z.B. in Form von PDI-aktiven Filtersystemen für die Wasseraufbereitung oder Textilien im technischen und medizinischen Sektor, erscheint daher besonders sinnvoll.

Die bisher untersuchten PDI-basierten Ansätze zur antimikrobiellen Ausrüstung von Polymeroberflächen bedienen sich zumeist aufwendiger chemisch-kovalenter Methoden zur PS-Immobilisierung und/oder *ab initio* Synthesen der gesamten Polymere. Im Gegensatz dazu werden in dieser Arbeit erstmalig zwei Ansätze untersucht, die sowohl kommerzielle Substrate als auch industrielle Standardverfahren zur Oberflächenveredelung verwenden: Eine Elektronenstrahl-Funktionalisierung von steriltechnischen Mikrofiltrationsmembranen und eine textiltechnologische Funktionalisierung von Polyestergeweben, wie sie z.B. für Reinraumbekleidung verwendet werden. Für die Charakterisierung der Polymeroberflächen werden neben Versuchen zur Zellviabilität, optisch-spektroskopische Methoden und erstmalig orts- sowie zeit-aufgelöste Messungen der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz herangezogen. Letztere bieten den einzigen direkten Zugang zur biologisch aktiven Wirkkomponente der PDI, dem $^1\text{O}_2$. Ein besonderes Augenmerk wird auf die $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik bei veränderter Mikroumgebung des im Polymer immobilisierten PS gelegt, da daraus Schlüsse auf seine Lokalisation gezogen werden können.

Im Resultat erweisen sich beide Funktionalisierungsansätze als geeignet für eine stationär vermittelte PDI. Dabei sind die textiltechnologisch funktionalisierten Polyestergewebe besonders wirkungsvoll und erzielen bereits

nach kurzer Weißlichtbestrahlung (≤ 30 min) eine phototoxische Zellinaktivierung des Modellbakteriums *Escherichia coli* von mindestens fünf Log_{10} -Stufen. Es zeigt sich außerdem, dass zusätzliche Untersuchungen zur Bindungsstabilität des PS speziell unter PDI-Bedingungen unumgänglich sind, da die kationischen PS eine sehr starke Affinität zu den negativ geladenen Zellwänden von Mikroorganismen aufweisen. Diese Untersuchungen wurden in bisherigen Publikationen weitestgehend ignoriert. Die Messungen der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik erweisen sich als eine vielversprechende Methode eine mögliche PDI-Aktivität vorab zu bewerten und bei der Entwicklung wichtige Impulse für die Oberflächenfunktionalisierung zu setzen. Schließlich ist eine systematisierte Methodologie zur Bewertung PDI-aktiver Oberflächen ein wesentliches Resultat dieser Arbeit.

Abstract

In view of the increasing risks to public health posed by the spread of antimicrobial resistance – especially antibiotic resistance – alternative approaches with a low resistance potential, a broad spectrum of action and low side effects to humans and the environment are becoming increasingly important. One such approach is the photodynamic inactivation of microorganisms (PDI). Its mechanism of action is based on the photosensitized generation of reactive oxygen species, preferably singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which lead to cell death through oxidative stress. The molecular agent responsible for the catalytic activation of oxygen, the photosensitizer (PS), does not have to penetrate into the target cell and is excited by visible light. The transfer into a stationary PDI on surfaces, e.g. in the form of PDI-active filter systems for water treatment or textiles in both technical and medical sector, appears to be particularly useful.

Previous PDI-based approaches for the antimicrobial modification of polymer surfaces mostly made use of complex chemical-covalent methods and/or *ab initio* syntheses of the polymers. In contrast, two approaches using commercially available substrates as well as industrial standard methods for surface modification are investigated in this work for the first time: An electron beam functionalization of microfiltration membranes for sterile filtration applications and a textile finishing functionalization of polyester fabrics typically used for cleanroom clothing. For characterization of the functionalized polymer surfaces, cell viability experiments, optical spectroscopic methods and – for the first time – spatially- and time-resolved measurements of the $^1\text{O}_2$ -luminescence are used. The latter method presents the only direct access to detection of the biologically active component, the $^1\text{O}_2$. Special attention is given to the $^1\text{O}_2$ luminescence kinetics upon altered microenvironments of the immobilized PS, leading to crucial inferences regarding the PS localization within the polymer.

As a result, both functionalization methods prove to be suited for a stationary PDI. Among them, the polyester fabrics functionalized by textile finishing are particularly effective, exhibiting a phototoxic cell inactivation of the model bacterium *Escherichia coli* of at least five Log_{10} levels after only short exposure to white light (≤ 30 min). It is also shown that additional investigations on the binding stability of the PS – especially under PDI conditions – are inevitable, since the cationic PS have a very strong affinity to the negatively charged cell

walls of microorganisms. These examinations have been largely ignored in previous publications. The measurements of the $^1\text{O}_2$ luminescence kinetics prove to be a promising method to evaluate a possible PDI activity in advance and to set important impulses for surface functionalization during development. Finally, a systematized methodology for the evaluation of PDI-active surfaces is an essential outcome of this work.

Abkürzungen

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
CDI	Carbonyldiimidazol
DRUV	diffuse Reflexion im UV-VIS
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (gramnegatives Bakterium)
eSpin	Elektrospinnen
e-Strahl	Elektronenstrahl (Strahlenbündel aus Elektronen)
FP	Filterpapier (Rundfilter)
IC	<i>internal conversion</i> , innere Umwandlung
IOM	Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung Leipzig
ISC	<i>intersystem crossing</i> , Interkombination
FWHM	<i>full width at half maximum</i> , Halbwertsbreite
KBE	koloniebildende Einheit
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium für Bakterien)
M&M	Plattenausählung nach Miles, Misra und Irwin
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (grampositives Bakterium)
NIR	nahes Infrarot
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Photodynamische Inaktivierung
PDT	Photodynamische Therapie
PES	Polyethersulfon
PET	Polyethylenterephthalat (Polyester)
PET ⁺	kationisch anfärbbares PET
PET ^a	alkalisch vorbehandeltes PET
PS	Photosensibilisator
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rs	großporige Rückseite der Mikrofiltrationsmembranen
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i> , Signal-Rausch-Verhältnis
TCMPC	zeitkorrelierte Multiphotonenzählung

TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-Methyl-4-Pyridinio)Porphyrin Tetra(p-Toluensulfonat), CAS 36951-72-1
TPPS	5,10,15,20-Tetrakis-(4-Sulfonatphenyl)-21,23H-Porphyrin Tetrahydrat, CAS 35218-75-8
TriMPyP	5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-(Tri-N-Methyl-4-Pyridinio) Porphyrin Trichlorid, CAS 211360-21-3
vs	kleinporige <i>Vorderseite</i> der Mikrofiltrationsmembranen

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	5
Abstract.....	7
Abkürzungen.....	9
Kapitel 1: Einleitung	15
1.1 Verbreitung multiresistenter Bakterien: Ursachen und Gegenmaßnahmen	16
1.2 Das Potenzial zur Nutzung der PDI auf Oberflächen	19
1.3 Photodynamisch aktive Oberflächen für die PDI: Stand der Forschung und Entwicklung	21
1.4 Problemstellung und Zielsetzung	24
Kapitel 2: Relevante Grundlagen der PDI	27
2.1 Der Photodynamische Effekt.....	28
2.1.1 Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies.....	28
2.1.2 Photosensibilisierte Anregung reaktiver Sauerstoffspezies.....	29
2.2 Singulett-Sauerstoff	32
2.2.1 Photosensibilisierte Anregung von Singulett-Sauerstoff.....	32
2.2.2 Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff.....	33
2.3 PDI grampositiver und gramnegativer Bakterien	35
2.3.1 Aufbau grampositiver und gramnegativer Bakterien.....	35
2.3.2 Antibakterielle PDI	36
2.4 Photosensibilisatoren für die PDI auf Oberflächen	37
2.4.1 Anforderungen an die Photosensibilisatoren	37
2.4.2 Die Porphyrine TMPyP und TPPS	38
Kapitel 3: Materialien und Untersuchungsmethoden.....	41
3.1 Verwendete Photosensibilisatoren und Bakterienstämme	42
3.1.1 Photosensibilisatoren.....	42
3.1.2 Bakterienstämme.....	43
3.2 Methoden.....	44
3.2.1 PS-Nachweis mit diffuser Reflexionsspektroskopie im UV-VIS	45
3.2.2 Ortsaufgelöster Nachweis der PS-Fluoreszenz und ¹ O ₂ -Generierung.....	46
3.2.3 Auswertung der NIR-Lumineszenzkinetik	49
3.2.4 PDI-Versuche.....	51
3.2.5 Ergänzende Charakterisierung: Stationäre Absorption und Fluoreszenz	55
3.2.6 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer PS-Extraktion durch Bakterien	56
Kapitel 4: Elektronenstrahl-funktionalisierte Mikrofiltrationsmembranen	57
4.1 Funktionalisierung der Membranoberflächen	58

4.1.1	Mikrofiltrationsmembranen	58
4.1.2	Elektronenstrahlvermittelte Immobilisierung des Photosensibilisators	59
4.2	Physikalische Charakterisierung der funktionalisierten Membranen	61
4.2.1	Membrantopologie und Filtereigenschaften nach Elektronenbestrahlung.....	62
4.2.2	Einfluss des e-Strahls auf die Immobilisierung des Photosensibilisators	62
4.2.3	Nachweis der Photosensibilisator-Fluoreszenz auf der Membranoberfläche	65
4.2.4	Zeitaufgelöste Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz der PS-dotierten Membranen.....	68
4.2.5	Extraktionsversuche und Stabilität der Immobilisierung	70
4.3	PDI-Aktivität der funktionalisierten Membranen.....	73
4.3.1	Semiquantitative PDI von Bakterien	73
4.3.2	Quantitative Zellviabilität nach PDI von <i>E. coli</i>	74
4.4	Extraktion des Photosensibilisators durch Bakterien.....	76
4.5	Photodegradation und Photostabilität der funktionalisierten Membranen.....	79
4.6	Zusammenfassende Bewertung	82
Kapitel 5: Funktionalisierte Textiloberflächen für die PDI.....		85
5.1	Funktionalisierung der Textiloberflächen	86
5.1.1	Kovalente Funktionalisierung.....	86
5.1.2	Textiltechnologische Funktionalisierung.....	87
5.2	Charakterisierung der kovalenten TriMPyP-Immobilisierung	89
5.2.1	Photophysikalische Eigenschaften des TriMPyP im Vergleich zum TMPyP	89
5.2.2	TriMPyP-Dotierung und Bindungsstabilität.....	91
5.2.3	Photosensibilisator-Fluoreszenz nach kovalenter Funktionalisierung	91
5.3	Charakterisierung der textiltechnologischen TMPyP-Immobilisierung.....	93
5.3.1	TMPyP-dotierung und Bindungsstabilität	93
5.3.2	Photosensibilisator-Fluoreszenz nach textiltechnologischer Funktionalisierung	96
5.4	Vergleich der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz beider Funktionalisierungsansätze	98
5.5	Phototoxizität der Textilproben	103
5.6	PS-Extraktion und -Photostabilität des der antimikrobiellen Probe I1nb	106
5.6.1	TMPyP-Extraktion mit <i>E. coli</i>	106
5.6.2	TMPyP-Photostabilität des Textilgewebes.....	108
5.7	Zusammenfassende Bewertung	109
Kapitel 6: Schlussfolgerungen und Ausblick		113
Literaturverzeichnis		123
Abbildungsverzeichnis		151
Publikationen des Autors.....		159
Danksagung.....		161
Eigenständigkeitserklärung.....		163

Kapitel 1:

Einleitung

- 1.1 Verbreitung multiresistenter Bakterien: Ursachen und Gegenmaßnahmen**
- 1.2 Das Potenzial zur Nutzung der PDI auf Oberflächen**
- 1.3 Photodynamisch aktive Oberflächen für die PDI: Stand der Forschung und Entwicklung**
- 1.4 Problemstellung und Zielsetzung**

1.1 Verbreitung multiresistenter Bakterien: Ursachen und Gegenmaßnahmen

Die Ausprägung von Multiresistenzen gegen Antibiotika bei einer immer größer werdenden Zahl pathogener Bakterien stellt eine ernstzunehmende klinische und gesellschaftliche Herausforderung dar [1, 2]. Seit Jahren warnt die Weltgesundheitsorganisation vor einem ‚post-antibiotischen Zeitalter‘ [3] und die Problematik rückt zusehends in den Fokus nationaler sowie multinationaler Entwicklungs- und Gesundheitsinstitutionen [4–8]. Der in diesem Zusammenhang wohl prominenteste Erreger ist der grampositive Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, kurz MRSA¹. Das Europäische Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) berichtet im Rahmen des EARS²-Netzwerkes von einer Häufigkeit von ca. 11 % in Deutschland bis hin zu 47 % in Portugal MRSA-positiver Isolate für 2015 – der europäische mit der Gesamtpopulation gewichtete Durchschnitt der am EARS-Netzwerk teilnehmenden Länder liegt bei 17 % [9]. Dabei handelt es sich um Krankenhaus-Isolate (Hospital-assoziierte MRSA-Isolate), die aufgrund typischer Risikofaktoren, wie z.B. Immunsuppression, chronische Wunden, invasive klinische Eingriffe, Antibiotikatherapie etc., eine besondere Rolle einnehmen und immer lebensbedrohlicher werden [10]. Durch gezielte MRSA-Surveillance³ und eine höhere Sensibilisierung gegenüber o.g. Problematik ist in Europa die Zahl Hospital-assoziiierter MRSA-Isolate seit einigen Jahren zwar leicht rückläufig, jedoch mit stagnierender Tendenz [12]. Zusätzlich werden vermehrt auch sogenannte *Community*- und *Livestock*-assoziierte Isolate beobachtet, die an Orten ohne typische Risikofaktoren auftreten [13] und sogar den natürlichen Wasserkreislauf und das Erdreich betreffen können [14, 15]. Neben dem MRSA sind auch andere multiresistente Bakterienspezies auf dem Vormarsch, darunter pathogene gramnegative Spezies [16, 17] (Abb. 1.1-1). Das ist besonders besorgniserregend, da gegen gramnegative Bakterien generell deutlich weniger wirksame Antibiotika zur Verfügung stehen [18, 19]. Eine stetig wach-

¹ Inzwischen hat sich auch die Nomenklatur des MRSA als **M**ultiresistenter **S**taphylococcus **a**ureus etabliert, da die früher nur Methicillin-resistenten Keime zunehmend auch weitere Antibiotikaunempfindlichkeiten aufweisen und Methicillin im Handel nicht mehr erhältlich ist.

² EARS: European Antimicrobial Resistance Surveillance

³ Neben der freiwilligen Übermittlung von Resistenznachweisen besteht seit 2016 eine Meldepflicht für den direkten MRSA-Nachweis [11].

sende Weltbevölkerung und alternde Gesellschaften wirken zudem stark verschärfend auf die globalen Herausforderungen, die mit der Ausbreitung von Multiresistenzen verbunden sind. Bestimmende Faktoren sind vor allem die kommerzielle Massentierhaltung [20, 21], der erschwerte Zugang zu einer sauberen Trinkwasserversorgung [22] und die Zunahme ambulant betreuter Pflegebedürftiger im außerklinischen Bereich [23].

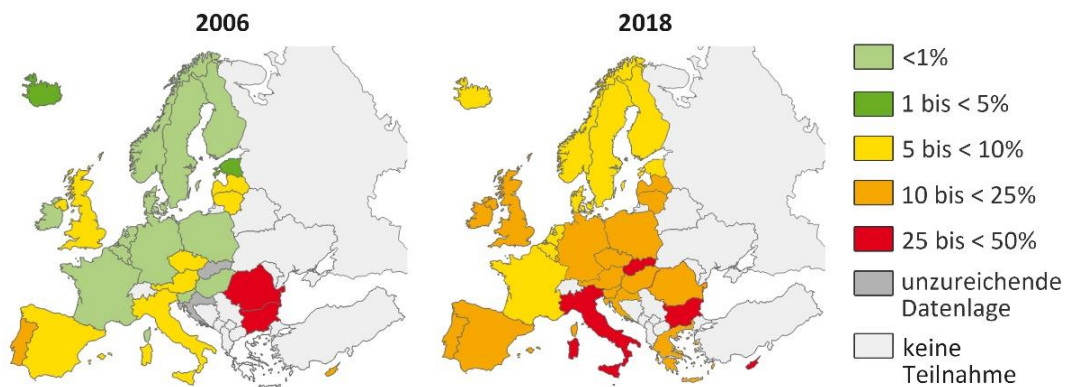


Abb. 1.1-1 Zunahme des Anteils gramnegativer *Escherichia coli* mit einer Resistenz gegen das Breitspektrum-Cephalosporin dritter Generation in Blut- und Liquor-Isolaten: am EARS-Netzwerk teilnehmende Länder im Zeitraum zwischen 2006 und 2018, adaptiert nach [7, 24].

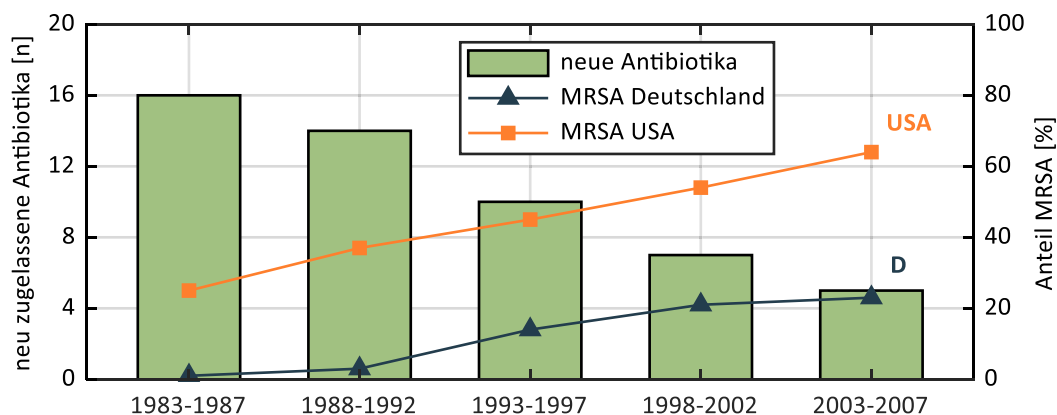


Abb. 1.1-2 Gegenüberstellung weltweit neuzugelassener Antibiotika und Hospital-assoziiert MRSA in Deutschland sowie den USA zwischen 1983 und 2007, adaptiert nach [25].

Entscheidend für die rasante Zunahme von Antibiotikaresistenzen sind der bereits vorhandene Pool übertragbarer Resistenzgene (auch über Artengrenzen hinaus) und der durch den Antibiotikaeinsatz ausgeübte Selektionsdruck zugunsten resistenter Erreger [26–28]. Daraus ergeben sich auch die prinzipiell-

len Gegenmaßnahmen zur Eindämmung dieser Entwicklung: Erstens, eine Begrenzung der Verbreitung resistenter Erreger durch konsequente antiseptische Prophylaxe an Orten mit konzentrierten Risikofaktoren [29–35] (medizinische Einrichtungen, Pflegeeinrichtungen, Nutztierverarbeitungsanlagen etc.) und zweitens, ein zielgerichteter aber kritischer Antibiotikaeinsatz [36, 37] bzw. die Entwicklung anderer und von bereits vorhandenen Resistenzen unabhängiger Inaktivierungsansätze mit geringem Selektionsdruck [38]. Stellt man insbesondere die Entwicklung von Resistenzen der sinkenden Anzahl neuzugelassener Antibiotika gegenüber (Abb. 1.1-2), wird deutlich, dass die Etablierung alternativer Ansätze zur klassischen Antibiose unumgänglich ist, selbst wenn Reserveantibiotika auch streng als solche verwendet würden [39, 40]. Die PDI⁴ bietet das Potenzial beide o.g. Maßnahmen zu adressieren: ein Inaktivierungsprinzip mit geringem Resistenzrisiko und eine auf Oberflächen mit anhaltenden selbstdesinfizierenden Eigenschaften übertragbare Anwendbarkeit. Ihr Wirkprinzip ist den Bakterien übergeordnet und lässt sich auch auf andere Mikroorganismen ausweiten.

⁴ In dieser Arbeit wird die Nutzung des photodynamischen Effektes (Kap. 2.1) zur Inaktivierung von Bakterien und anderen Mikroorganismen bewusst ausschließlich als Photodynamische Inaktivierung (PDI) bezeichnet, da die in der Literatur häufig synonym verwendeten Begriffe *antimikrobielle Photodynamische Therapie* (aPDT) und *Photodynamische antimikrobielle Chemotherapie* (PACT) am Kern des Prinzips vorbeigehen. Dies gilt insbesondere für PDI-aktive Oberflächen, die i. d. R. keine therapeutische Maßnahme darstellen.

1.2 Das Potenzial zur Nutzung der PDI auf Oberflächen

Die PDI basiert auf der photosensibilisierten Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die direkt oder über die Bildung von Sekundärradikalen Zellbestandteile von Bakterien und anderen Mikroorganismen oxidieren und letztlich zum Zelltod führen [41, 42]. Der Aktivierungsmechanismus verwendet Licht des sichtbaren Spektrums und einen als Photosensibilisator (PS) wirkenden Farbstoff, der seine lichtinduzierte Anregungsenergie auf umliegende Sauerstoffmoleküle überträgt und vorzugsweise zur Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) führt. Danach geht der PS in seinen Grundzustand über und steht für eine erneute Anregung zur Verfügung. Dabei ist es egal, ob die Photosensibilisierung aus dem Innern der Zellen, der Zellmembran oder von Außerhalb induziert verläuft. Und ebenda liegt der Vorteil des Prinzips: Im Gegensatz zur Wirkweise von Antibiotika, die jeweils an ganz spezifische metabolische Prozesse oder Zellbestandteile geknüpft ist [43], wirkt die PDI über unspezifische Oxidationsprozesse. Daraus resultiert auch das breite Anwendungsspektrum der PDI [42], das sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien umfasst. Außerdem ist eine Inaktivierung von Algen, Cyanobakterien, Viren, Pilzen, den sehr widerstandsfähigen Pilzsporen [44–50] oder sogar von Virulenzfaktoren möglich [51–54]. Viele in der PDI untersuchte PS wirken über Gruppen von Mikroorganismen hinweg [55, 56]. Somit sind sie auch dazu geeignet in heterogenen Umgebungen, z. B. präventiv gegen die Bildung von Biofilmen oder zur Wasseraufbereitung, eingesetzt zu werden [57–59]. Im Gegensatz zu gängigen chemischen Desinfektionsmitteln ist die PDI ein sehr schonendes Prinzip und stellt kein Umweltrisiko dar [60–63]. Die zumeist organischen PS sind ohne Lichteinwirkung inaktiv und können biologisch abgebaut werden. Der unspezifische Wirkmechanismus der PDI durch die lawinenartig verlaufenden Oxidationsprozesse bedingt einen weiteren Vorteil: Der fehlende Selektionsdruck macht eine Ausbildung von Resistenzen extrem unwahrscheinlich [25, 64–66]. Insbesondere muss in diesem Zusammenhang keine auf die Ausbildung von Resistenzen verschärfend wirkende Unterdosierung befürchtet werden, wie es z. B. bei klassischen Desinfektionsmitteln der Fall ist [67–69].

Die PDI wird durch Licht des sichtbaren Spektrums induziert und der PS muss nicht von der mikrobiellen Zelle aufgenommen oder verbraucht werden.

Daher hat die PDI ein großes Potenzial in Außenanwendungen – z. B. als Methode zur lokalen Wunddesinfektion, aber vor allem in Form von beständigen selbstdesinfizierenden Oberflächen und Materialien. Besonders in ihrer potentiellen Nutzung zur antimikrobiellen Prophylaxe auf festen Oberflächen liegt das Potenzial der PDI darin, einen Beitrag zur Eindämmung der rasanten Zunahme resistenter pathogener Mikroorganismen zu leisten [70–72]. Mit diesen Überlegungen können folgenden konkrete Anwendungen der PDI formuliert werden:

- Selbstdesinfizierende Oberflächen und Textilien (z. B. in medizinischen und technischen Einrichtungen oder Tiermastverarbeitungsanlagen)
- PDI-aktive polymere Auflagen zur Wunddesinfektion
- Filter für die Wasseraufbereitung in Form von funktionalisierten Mikrofiltrationsembranen
- medizinische Filter und Filteranlagen durch funktionalisierte Polymere
- Verhinderung der Bildung von Schimmelpilzen und Biofilmen auf Baustoffen durch polymere Beschichtungen

Zur breiten Umsetzung dieser Anwendungen in der Praxis muss gewährleistet werden, dass der PS nicht vom menschlichen Organismus aufgenommen wird, da er sonst eine systemische Photosensibilisierung verursachen könnte [73–75]. Das macht eine dauerhafte Fixierung des PS auf den Oberflächen notwendig, wodurch auch die Langlebigkeit des funktionellen Materials erhöht wird. Zusätzlich wird dadurch das mikrobielle Resistenzpotenzial und andere noch unbekannte Risiken weiter minimiert, da die aktive Wirkkomponente nicht in die Umwelt gelangt [61, 76, 77].

1.3 Photodynamisch aktive Oberflächen für die PDI: Stand der Forschung und Entwicklung

Die PDI lässt sich historisch in zwei Phasen einteilen. Seit der erstmaligen Beschreibung der *Photodynamie fluoreszierender Stoffe*⁵ und ihrer Wirkung auf Einzeller durch die Arbeiten um Hermann von Tappeiner Anfang des letzten Jahrhunderts [78–80] konzentrierte sich die Forschung zunächst auf die Entwicklung der Photodynamischen Therapie (PDT) von Tumoren. Der Ansatz der PDI von Bakterien oder anderen Mikroorganismen wurde bis Mitte der neunziger Jahre weitestgehend ignoriert. Dafür lassen sich zwei Gründe ausmachen: Erstens, der Siegeszug antibiotischer Substanzen [81] und die Ignoranz gegenüber der bereits von Alexander Fleming, dem Entdecker des Penicillins, beschworenen Entwicklung von Antibiotikaresistenzen [82]. Zweitens, die dürftige Wirksamkeit der für die PDT entwickelten PS gegen Mikroorganismen, insbesondere gramnegative Bakterien. Das Wiederaufleben der PDI wurde im Verlauf der 90er Jahre eingeläutet. Dies gelang durch die Beschreibung ihrer Wirkmechanismen gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und die Entdeckung, dass durch die Wahl geeigneter PS, insbesondere kationischer Porphyrine, beide Bakterienarten ohne Hilfssubstanzen effizient inaktiviert werden können [83–87]. Klinisch wurde die PDI bis heute weitestgehend nur für zahnmedizinischen Behandlungen untersucht [88–90]. Die Weiterentwicklung der PDI hin zur Nutzung PDI-aktiver Oberflächen stellt ein recht neues Feld dar.

Der aktuelle Stand der Forschung umfasst nur ca. 80 Fachpublikationen und eine Übersichtsarbeit [72] zu funktionalisierten Oberflächen für die PDI. Zwei Drittel dieser Publikationen sind auf die letzten zehn Jahre datiert. Mit nur drei Ausnahmen werden darin ausschließlich natürliche und künstliche Polymersubstrate untersucht, da diese die größte Anwendungsrelevanz besitzen und vielfältige Modifizierungsstrategien erlauben. Letztere enthalten eine PS-Immobilisierung⁵ durch Einbettung [91–99], Adsorption in Form der eher schwach bindenden Physisorption [100–105], sowie Chemisorption mit domi-

⁵ Der Begriff der PS-Immobilisierung wird im Folgenden übergeordnet zu einer nicht immer näher definierten bzw. definierbaren physikalischen oder chemischen Bindung eines PS in oder auf einem flächenbildenden Substrat verwendet.

nierend ionischen Wechselwirkungen [106–112] bis hin zur kovalenten Koppelung [113–124]. Die einzige Funktionalisierung eines kommerziellen Substrates wurde von Mesquita et al. durchgeführt [125]. Die restlichen Arbeiten verwenden *ab-initio*-Synthesen der funktionalisierten Materialien – z. B. die Herstellung PS-dotierter Papiersubstrate aus modifizierten Cellulose-Nanokristallen [126, 127]. Als PS werden überwiegend Porphyrin-, Xanthen- und Phenothiazinderivate, aber auch Ruthenium-Komplexe, genutzt – also PS, die aus der PDI-Forschung in Suspension bekannt sind und sich zumeist durch gute Wasserlöslichkeit und eine hohe $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute auszeichnen (s. Kap. 2.4.1). Bei der Funktionalisierung dominieren chemische Ansätze für eine kovalente Anbindung des PS und eSpin-Verfahren⁶, bei denen lediglich eine Einbettung bzw. elektrostatische Wechselwirkung des PS mit dem Substrat realisiert wird. Beide Strategien haben den Nachteil, dass sie kostenintensiv und teilweise sehr aufwendig sind. So erfordert die kovalente Anbindung in den meisten Fällen eine asymmetrische Substitution des PS und eine bindungsspezifische Aktivierung des Substrates. Dafür müssen zum Teil als $^1\text{O}_2$ -Quencher bekannte Amine [128–130] eingesetzt werden [116, 118, 122]. Industriell sind eSpin-Verfahren zwar deutlich universeller umsetzbar, beschränken sich aber wegen ihrer geringe Prozesseffizienz noch überwiegend auf kleine Spezialanwendungen [131].

Die meisten Arbeiten zu PDI-aktiven Oberflächen stellen *Proof of Principle* Ansätze dar, die sich keiner systematischen oder gar standardisierten Methodik bedienen. So zeigt sich, dass obwohl $^1\text{O}_2$ als Hauptvermittler der phototoxischen Wirkung das Fundament einer PDI-aktiven Oberfläche bildet, sein direkter Nachweis in weniger als einem Viertel der betreffenden Publikationen durchgeführt wird. Dieser basiert auf der stationären und/oder zeitaufgelösten Detektion des sehr schwachen Lumineszenzsignals im nahen Infrarot (NIR), das bei der quantenmechanisch stark eingeschränkten direkten Desaktivierung von $^1\text{O}_2$ beobachtet werden kann. Bei ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) bietet die zeitaufgelöste NIR-Lumineszenz den einzigen Zugang zur $^1\text{O}_2$ -Generierung, -Diffusion und -Desaktivierung, woraus wesentliche Rückschlüsse auf PDI-relevante Mechanismen gezogen werden können

⁶ Elektrospinnen, engl. *electrospinning* oder kurz eSpin: Herstellung eines Polymervlieses auf Basis dünner Filamente, die aus einer Polymerlösung in einem elektrischen Feld gesponnen werden.

[132]. Die dafür erforderlichen technischen Mittel und Erfahrung stehen aktuell nur wenigen Arbeitsgruppen zur Verfügung. Oftmals ist eine befriedigende Signalausbeute nur unter unnatürlichen Umgebungsbedingungen, z. B. durch zusätzliche Sauerstoffbegasung oder Nutzung von D₂O statt H₂O, möglich. Die erstmalige zeit- und orts aufgelöste ¹O₂-Detektion auf einer Oberfläche unter *in situ* Bedingungen gelang 2013 in der AG Photobiophysik der HU Berlin [133, 134]. Seit 2016 steht zudem ein für die PDI auf Oberflächen optimierter ¹O₂-Messplatz zur Verfügung [135, 136], der bezüglich der relativen Signalintensität und Ortsauflösung weltweit einzigartig ist.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Ausgehend vom aktuellen Stand der Entwicklung PDI-aktiver Oberflächen ergeben sich zwei wesentliche Defizite: Zum einen mangelt es an Funktionalisierungsstrategien, die eine großtechnische Produktrealisierung reizvoll machen. Zum anderen steht die eigentliche biologisch wirksame Komponente, nämlich der $^1\text{O}_2$, nur selten im Mittelpunkt der Untersuchungen, sodass eine zielgerichtete Materialentwicklung behindert wird. So ist die PS-Immobilisierung im Material zwar eine notwendige, jedoch keine hinreichende Bedingung für eine beständige PDI-aktive Oberfläche. Diese wird erst durch eine effiziente $^1\text{O}_2$ -Generierung und vor allem seine Diffusion zu den Mikroorganismen realisiert.

Ziel dieser Arbeit ist somit eine großtechnisch motivierte Entwicklung PDI-aktiver Polymeroberflächen mit Fokus auf deren $^1\text{O}_2$ -Generierung.

Für die Funktionalisierung wurden drei Ansätze ausgewählt und mit Kooperationspartnern aus dem Bereich der technischen und wissenschaftlichen Oberflächenmodifizierung umgesetzt: Eine e-Strahl⁷-vermittelte Funktionalisierung von kommerziellen Mikrofiltrationsmembranen und eine kovalente bzw. textiltechnologische Funktionalisierung von kommerziellem Polyestergerewebe, wie es für die technische und medizinische Reinraumbekleidung verwendet wird. Damit werden in dieser Arbeit explizit kommerzielle Substrate untersucht und – mit Ausnahme der kovalenten Textilfunktionalisierung – eine unmittelbar industriell umsetzbare Funktionalisierungsstrategie verfolgt. Die Wahl der Oberflächen adressiert konkrete technische Problemstellungen, die eine antimikrobielle Ausrüstung der verwendeten Materialien erfordern, wie im Folgenden verdeutlicht wird.

Mikrofiltrationsmembranen werden überwiegend zur Sterilfiltration in mikrobiologischen (z. B. pharmazeutischen) und lebensmitteltechnischen (Filtration von Milch, Säften, Bier usw.) Bereichen verwendet [137]. Aber auch eine Verwendung zur großtechnischen Wasseraufbereitung gewinnt an Be-

⁷ Ein Elektronenstrahl, kurz e-Strahl, wird technisch durch die Freisetzung von Elektronen in einer Glühkathode, deren Beschleunigung und Bündelung erzeugt. Die e-Strahl-Materialbearbeitung bildet ein industrielles Fertigungsverfahren.

deutung und wird als kosteneffektive, industriell umsetzbare und umweltfreundliche Antwort auf den zunehmend kritischen Zugang zu sauberem Trinkwasser gehandelt [60, 138–140]. Eine maßgebliche Rolle als kostenlimitierender Faktor spielt Membranfouling, das durch Anlagerung von Bakterien und Algen oder ganz allgemein biologischer Materie zu einer Materialdegradation und Verstopfung führt [141–143]. Prinzipiell können zwei Strategien zur Reduzierung des Foulings verfolgt werden: Passive Mechanismen zur Adhäsionsminimierung biologischer Materie, wie z. B. eine veränderte Membranhydrophobizität oder -rauheit [144, 145], und aktive Mechanismen in Form von selbstdesinfizierenden Filtermembranen auf Basis von eingebetteten antimikrobiellen Substanzen [138, 146], wie z. B. Silberpartikel [147] oder Titan-dioxid [148, 149].

Bekleidung und Textilien im Allgemeinen bieten aufgrund ihrer hohen inneren Oberfläche und der zumeist guten Feuchtigkeitsaufnahme ein hervorragendes Substrat für Keime. Daher erscheint besonders im medizinischen und technischen Sektor eine antimikrobielle Ausrüstung von Textilien sinnvoll. Dafür werden überwiegend klassische Biozide, wie Triclosan, quartäre Ammoniumverbindungen und Polyhexanid, aber auch Silber-Nanopartikel, Schwermetalle oder Chitosan, verwendet. Zugunsten des Tragekomforts bestehen Labor- und Arztkittel i. d. R. aus 100 % Baumwolle oder einem Baumwoll-Polyester-Gemisch. Aufgrund der hohen Anforderungen an Abriebfestigkeit werden im Bereich der Reinraumbekleidung fast ausschließlich Textilien aus 100 % Polyester verwendet. [150–152]

Ein PDI-basierter Ansatz zur aktiven Reduzierung von Membranfouling oder zur antimikrobiellen Ausrüstung von Textilien bietet hier einen vielversprechenden und umweltfreundlichen Ansatz, der vor allem die Problematik mikrobieller Resistenzen umgeht.

Ein Hauptaspekt dieser Arbeit ist die Einbeziehung zeitaufgelöster $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessungen auf den funktionalisierten Oberflächen und deren Eingliederung in die Bewertung des PDI-Potenzials der Materialien. Dabei soll untersucht werden, inwiefern anhand der $^1\text{O}_2$ -Kinetik und anderer photophysikalischer Parameter (z. B. der orts aufgelösten PS-Fluoreszenz) Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen von Substrat, PS und $^1\text{O}_2$ gezogen und notwendige Anforderungen an PDI-aktive Oberflächen (z. B. Lokalisation des PS im Substrat) identifiziert werden können.

Zusammengefasst werden folgende drei Fragestellungen bearbeitet:

1. Bildet die e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung eine valide Methode zur einfachen PS-Immobilisierung auf einer kommerziellen Filtermembran?
2. Ist im Vergleich zu kovalenten Kopplungsmechanismen ein textiltechnologischer Ansatz als industriell leicht umsetzbare Methode für die Funktionalisierung von Textilgeweben geeignet?
3. Welche Möglichkeiten und Grenzen bietet die Einbeziehung orts- und zeit aufgelöster $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessungen für eine vorzeitige Bewertung des PDI-Potenzials funktionalisierter Oberflächen?

Die hier angestrebte Materialfunktionalisierung war nur durch die Zusammenarbeit der AG Photobiophysik (PBP) mit technisch und wissenschaftlich führenden Kooperationspartnern auf dem Gebiet der Materialveredelung möglich. Für die e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung von Mikrofiltrationsmembranen besteht eine Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung in Leipzig (IOM). Die verantwortliche AG für Funktionale Membranen und poröse Polymermaterialien ist dabei auf membranbasierte Filtrationssysteme und deren e-Strahl-Modifizierung für eine photo- und biokatalytische Aktivierung spezialisiert. Die PDI-Funktionalisierung von Textilien wird im Zuge des FFG-geförderten (Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft) HEPS-Projektes („High Efficiency in PDI“) mit der Ortner Reinraumtechnik GmbH realisiert. Dabei wird die Kooperation neben der AG PBP, vom Lehrstuhl für Chemie der Kunststoffe (Montanuniversität Leoben) und dem Textilforschungsinstitut Thüringen e.V. (TITV) getragen.

Ein Forschungsschwerpunkt der AG PBP ist neben dem photodynamischen Effekt die zeitaufgelöste Detektion von $^1\text{O}_2$. Dabei kann die AG zahlreiche Meilensteine auf diesem Gebiet vorweisen [153–157, 134] und ist aktuell bei den $^1\text{O}_2$ -Detektionssystemen weltweit führend. Seit 2011 liegt zudem ein besonderer Fokus der AG PBP auf der PDI von Mikroorganismen, mit forschungsrelevanten Beiträgen zur PDI von Pilzen [47, 158], Biofilmen [159] und Mückenlarven [160], der erstmaligen Korrelation von $^1\text{O}_2$ -Kinetik und Phototoxizität [161] sowie der erstmaligen PDI phototropher Mikroorganismen [162].

Kapitel 2:

Relevante Grundlagen der PDI

2.1 Der Photodynamische Effekt

2.1.1 Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies

2.1.2 Photosensibilisierte Anregung reaktiver Sauerstoffspezies

2.2 Singulett-Sauerstoff

2.2.1 Photosensibilisierte Anregung von Singulett-Sauerstoff

2.2.2 Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff

2.3 PDI grampositiver und gramnegativer Bakterien

2.3.1 Aufbau grampositiver und gramnegativer Bakterien

2.3.2 Antibakterielle PDI

2.4 Photosensibilisatoren für die PDI auf Oberflächen

2.4.1 Anforderungen an die Photosensibilisatoren

2.4.2 Die Porphyrine TMPyP und TPPS

2.1 Der Photodynamische Effekt

Der Photodynamische Effekt basiert auf der photosensibilisierten Anregung von ROS (Sauerstoffradikale, Sauerstoffoxidantien, $^1\text{O}_2$), die im Verlauf weiterer Reaktionen Biomoleküle oxidieren. Die zielgerichtete Nutzung des photodynamischen Effektes wird in der Literatur vor allem als Photodynamische Therapie von Tumoren und Blutgefäßen aufgeführt (PDT), kann aber auch gegen Mikroorganismen verwendet werden (PDI). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind dabei dieselben und erfordern die Präsenz einer lichtaktiven Substanz, dem PS, und molekularen Sauerstoff, der i. d. R. ubiquitär vorkommt.

2.1.1 Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies

Molekularer Sauerstoff ist eines der wichtigsten Moleküle für Energiegewinnung und Stoffwechsel biologischen Lebens, bildet aber auch die Grundlage für viele toxische Reaktionen. Diese besondere Stellung ist dadurch gegeben, dass seine hohe Reaktivität durch Aktivierungsprozesse *angeschaltet* werden muss. Verantwortlich ist die einzigartige Elektronenkonfiguration des Sauerstoffmoleküls, die ihm im Grundzustand einen biradikalischen Triplettcharakter zuweist. Wegen des Spinverbots ist es als Triplettmolekül gegenüber allen anderen chemisch stabilen organischen Molekülen, die fast ausschließlich als Singulett vorliegen, sehr reaktionsträge. Daher muss das Sauerstoffmolekül aktiviert werden, was mittels Energietransfer, Elektronentransfer oder der Bildung von Übergangsmetallkomplexen möglich ist. [163] Der Natur stehen dafür zahlreiche chemische, physikochemische, biochemische und biologische Mechanismen zur Verfügung, die eine wesentliche Rolle in Prozessen wie der Photosynthese, Phagozytose, Atmungskette oder bei Entzündungsreaktionen spielen. Relevant für PDT und PDI ist die photosensibilisierte Aktivierung von Sauerstoff, also eine lichtinduzierte Anregung eines PS mit anschließendem Elektronen- bzw. Energietransfer zum Sauerstoff. Die nach diesem Primärprozess folgenden Reaktionen verlaufen als spontane Kettenreaktionen (Dunkelreaktionen), die zur Entstehung weiterer ROS oder Oxiden führen – in biologischen Systemen breitet sich die Photosensibilisierung daher i. d. R. lawinenartig aus. Biologisch relevante ROS sind das Hyperoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, das Hydroxyl-Radikal und Singulett-Sauerstoff. [164, 128, 165]

2.1.2 Photosensibilisierte Anregung reaktiver Sauerstoffspezies

Die oxygene⁸ photosensibilisierte Anregung von ROS und ihre anschließende toxische Wirkung kann vereinfacht als ein dreistufiger Prozess aufgefasst werden (Abb. 2.1-1). Dabei können zwei molekulare Primärprozesse unterschieden werden, die zur Entstehung der ROS führen. [166–170]

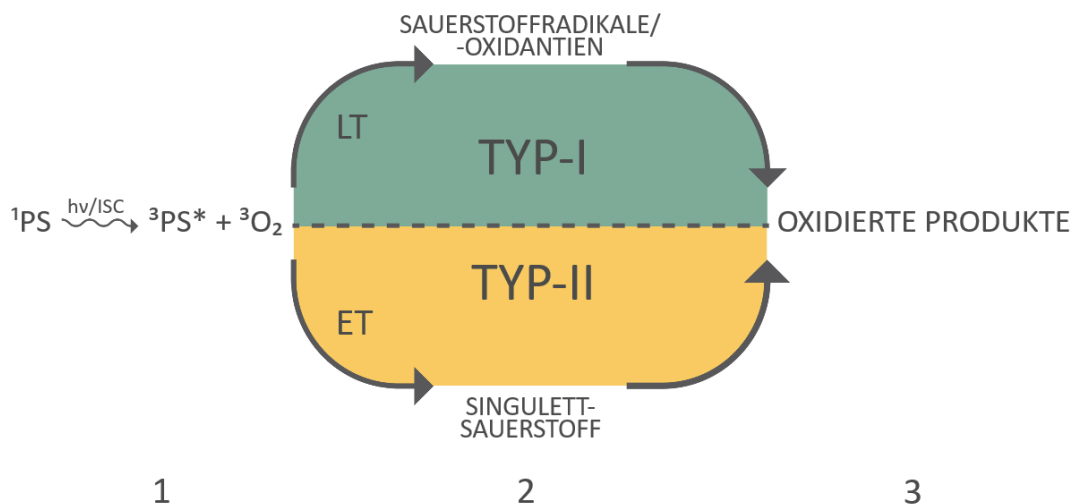


Abb. 2.1-1 Vereinfachte schematische Darstellung des Photodynamischen Effektes [171]. Schritt 1: Anregung des PS vom Singulett- (1PS) in den Triplettzustand ($^3PS^*$) nach Lichtabsorption ($h\nu$) und Interkombination (ISC). Schritt 2: Erzeugung von ROS nach Ladungstransfer (LT: Typ-I-Mechanismus) oder Energietransfer (ET: Typ-II-Mechanismus) unter Beteiligung von Sauerstoff im Grundzustand (3O_2). Schritt 3: Oxidation von Biomolekülen durch die gebildeten ROS.

Anregung des PS in den T_1 -Zustand: Im ersten Schritt erfolgt die Anregung des PS mittels Licht geeigneter Wellenlänge. Wesentlich ist, dass dafür weder UV- noch ionisierende Strahlen benötigt werden, die DNS-schädigend oder mutagen sein können [172, 173]. Im Gegensatz zur PDT, bei der ein therapeutisches Fenster gemäß der Absorption körpereigener Biomoleküle und der gewebespezifischen Eindringtiefe beachtet werden muss [169], ist für die PDI nur ein möglichst guter spektraler Überlapp des Anregungslichts mit der PS-Extinktion erforderlich. Dieser liegt im Bereich zwischen 400 und 700 nm, so-

⁸ In der Fachliteratur wird gelegentlich die Radikalbildung durch eine direkte Reaktion des angeregten Triplett-PS mit Substratmolekülen zur (Typ-III-) Photosensibilisierung hinzugezählt. Diese Reaktionen finden i.d.R. nur unter anoxigenen Bedingungen statt und können hier ignoriert werden. [41, 166]

mit kann auf Weißlicht bzw. einfaches Umgebungslicht zurückgegriffen werden. Bei der Anregung geht der als Singulett (S) vorliegende PS aus seinem elektronischen Schwingungsgrundzustand (S_{00}) in einen höherenergetischen elektronischen und vibronischen Zustand gleicher Multiplizität über (S_{nm}). Von diesem aus erfolgt eine schnelle (\sim ps) strahlungslose Relaxation über innere Umwandlung (auch *internal conversion*, kurz IC) und anschließende Schwingungsrelaxation in den schwingungsfreien ersten elektronisch angeregten Zustand (S_{10}). Die weitere Relaxation folgt auf zwei Wegen. Erstens, unter Spinerhaltung strahlend (Fluoreszenz) oder strahlungslos (IC) mit anschließender Schwingungsrelaxation in den ursprünglichen Grundzustand (S_{00}). Zweitens, durch Spinumkehr über Interkombination (auch *intersystem crossing*, kurz ISC) und Schwingungsrelaxation zum ersten angeregten Triplettzustand (T_{10}), von wo aus die weitere Relaxation zum S_{00} ebenfalls strahlend (Phosphoreszenz) oder strahlungslos (ISC) mit anschließender Schwingungsrelaxation erfolgen kann. Zur Vereinfachung der Nomenklatur wird im Folgenden die vibronische Anregung im Termschema vernachlässigt und auf den zweiten Index verzichtet. Das quantenmechanische Verbot des $S_1 \rightarrow T_1$ -Übergangs wird in erster Linie durch eine hohe Spin-Bahn-Kopplung und einen geringen energetischen Abstand der beteiligten Energieniveaus aufgebrochen. Diese Bedingungen werden von Molekülen mit ausgedehntem π -Elektronensystem begünstigt, sodass einige PS, insbesondere zyklische Tetrapyrrole (Porphyrine), ISC-Quantenausbeuten jenseits der 50 % aufweisen. Die T_1 -Relaxation ist wegen der Spinumkehr deutlich langlebiger, da sie quantenmechanisch verboten ist. Daher ist die in Lösung beobachtete Lebensdauer der Phosphoreszenz ($\sim \mu$ s) deutlich länger als die der Fluoreszenz (\sim ns).

Entstehung der ROS: In Gegenwart von molekularem Sauerstoff kann der PS im langlebigen T_1 -Zustand seine verbleibende Anregungsenergie für die Aktivierung von ROS übertragen. Dabei werden zwei molekulare Mechanismen unterschieden. Beim Typ-I-Mechanismus erfolgt ein Elektronentransfer, der unter Beteiligung umgebender Substratmoleküle zur Bildung von Sauerstoffradikalen und -oxidantien führt. Hierbei wird der PS durch die erfolgte Reduktion i.d.R. irreversibel verbraucht. Der für PDT und PDI wesentliche Primärprozess der Photosensibilisierung ist der Typ-II-Mechanismus, der auf einem direkten Energietransfer zum Sauerstoff beruht. Es entsteht der hoch reaktive

$^1\text{O}_2$, der PS geht in seinen ursprünglichen Grundzustand über und steht für eine weitere photosensibilisierte Reaktion zur Verfügung.

Zellschädigung: Nach der photosensibilisierten Aktivierung des Sauerstoffs folgen kettenartige Sekundärreaktionen (Dunkelreaktionen), die zur Entstehung weiterer hochreaktiver Spezies beitragen und zu unspezifischen oxidativen Schäden wichtiger Zellbestandteile (Membranen, Membranproteine, Membranlipide, Mitochondrien, DNS etc.) führen. Obwohl fast alle Zellen über antioxidative Schutzmechanismen verfügen, führt der nicht mehr zu bewältigende lawinenartig verlaufende oxidative Stress in letzter Konsequenz zum Zelltod. [174, 64]

Prinzipiell stehen die Typ-I- und Typ-II-Prozesse immer in Konkurrenz. Ihr Verhältnis hängt dabei primär vom PS, der Sauerstoff- und Substratkonzentration sowie anderen Umgebungsparametern ab. Unter physiologischen Bedingungen dominiert jedoch überwiegen der Energietransfer mit der Generierung von $^1\text{O}_2$. Insbesondere ist das für PDT sowie PDI und die dafür bevorzugten PS der Fall. Dabei kann die Bildung von $^1\text{O}_2$ nach Anregung des PS eine Ausbeute nahe 100 % erreichen. Das ist für die hier behandelten Oberflächenanwendungen der PDI umso wichtiger, da eine gewisse Photostabilität der PS für die Langlebigkeit der Systeme essentiell ist. Dadurch wird die Sonderstellung von $^1\text{O}_2$ für die hier vorliegende Arbeit noch weiter hervorgehoben. [41, 44, 175–177]

2.2 Singulett-sauerstoff

Molekularer Sauerstoff besitzt im Grundzustand in seinen zwei äußeren π^* -Elektronenschalen zwei ungepaarte Elektronen mit parallel ausgerichteten Spins, d.h. er liegt im Triplettzustand mit dem Termsymbol $^3\Sigma_g^-$ vor. Im ersten angeregten und einzigen biologisch relevanten Zustand, der als $^1\text{O}_2$ bezeichnet wird, befinden sich beide äußere Elektronen im gleichen π^* -Orbital. Das entsprechende Termsymbol lautet $^1\Delta_g$. Der Übergang zwischen diesen beiden Zuständen ist gemäß der Auswahlregel für Spin, Parität und Drehimpuls dreifach verboten und ihre Energiedifferenz beträgt ca. 0,98 eV bzw. 1270 nm. Die wichtigsten molekularen Mechanismen der photosensibilisierten $^1\text{O}_2$ -Generierung und seiner Desaktivierung werden im Jablonski-Diagramm in Abb. 2.2-1 zusammengefasst. [178–180]

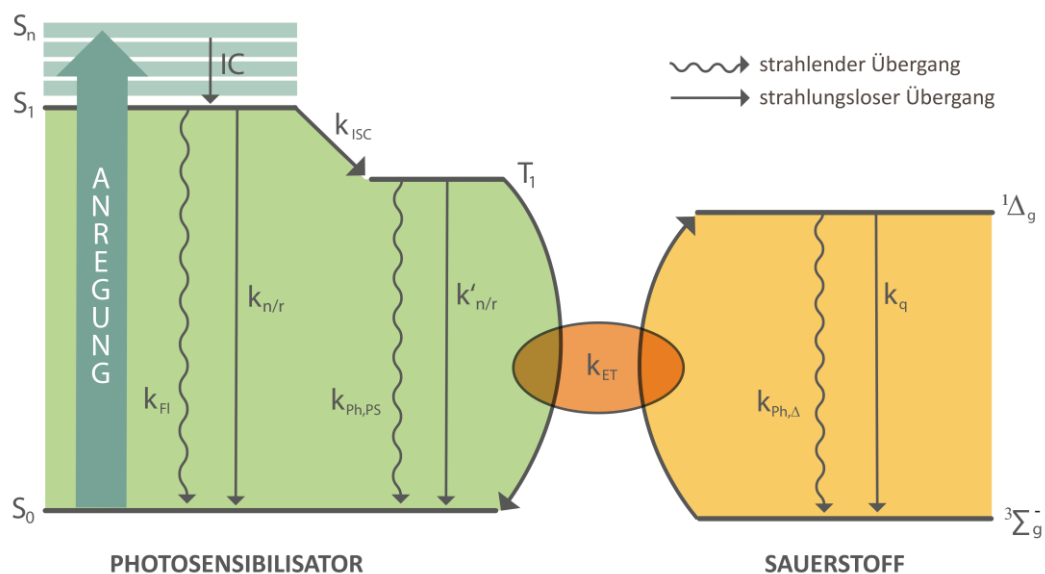


Abb. 2.2-1 Jablonski-Diagramm zur vereinfachten Illustration des Typ-II Mechanismus und der beteiligten Übergänge bei der Bildung und Desaktivierung von $^1\text{O}_2$ [171]. Ratenkonstanten k für FL: Fluoreszenz, Ph: Phosphoreszenz, IC: innere Umwandlung, ISC: Intersystem Crossing, n/r: nicht-strahlende Desaktivierung, ET: Energietransfer, q: Quenching. S, T: Singulett- bzw. Triplettzustand des PS, $^3\Sigma_g^-$ und $^1\Delta_g$ Termschemata des Grund- bzw. ersten angeregten Singulettzustands von molekularem Sauerstoff.

2.2.1 Photosensibilisierte Anregung von Singulett-sauerstoff

Bei der photosensibilisierten Anregung des $^1\text{O}_2$ kommt es zu einem Elektronenaustausch zwischen dem angeregten PS-Molekül und dem Sauerstoff unter Erhaltung der Gesamtspinzahl beider Reaktionspartner, bekannt als Dexter-

Transfer-Mechanismus [181]. Dabei müssen die beteiligten Molekülorbitale überlappen, d. h. es handelt sich um eine Stoßwechselwirkung beider Moleküle [182]. Im Gegensatz zu anderen konkurrierenden Übergängen verläuft dieser spinerlaubte Energietransfermechanismus damit sehr effizient. Die einzigen begrenzenden Größen sind die (in den meisten biologischen Systemen sehr schnelle) Sauerstoffdiffusion, die Langlebigkeit des T_1 -Zustandes des PS und die relative Lage der beteiligten Energieniveaus. Im Resultat ist der Energietransfer zum Sauerstoff die bestimmende Größe der T_1 -Lebensdauer. [183]

2.2.2 Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff

Bei der Desaktivierung von 1O_2 konkurrieren verschiedene Prozesse, die neben dem strahlenden Übergang vor allem durch physikalisches und chemisches Quenching dominiert werden. Deren Ratenkonstanten hängen empfindlich von der Mikroumgebung und der Quencherkonzentration ab. Die natürliche strahlende Lebensdauer von freiem 1O_2 ist wegen des dreifach verbotenen ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$)-Übergangs mit über 70 min sehr lang [184]. In der Gasphase und insbesondere organischen Lösemitteln wird das Verbot zwar durch Stöße mit umgebenden Molekülen aufgeweicht, die Ratenkonstante des strahlenden Übergangs bleibt dabei dennoch sehr gering. In Wasser wird z. B. weniger als jedes millionste 1O_2 -Molekül strahlend desaktiviert. Den dominierenden Prozess bildet physikalisches Quenching mit einer Schwingungsrelaxation unter Wärmeabgabe mit 1O_2 -Lebensdauern von ca. 50 ms in Raumluft bzw. 4 μ s in Wasser. Bestimmend ist hier neben der Teilchendichte des Lösemittels die Kopplung der beteiligten Schwingungsmoden, die von höherfrequenten Schwingungen der O-H und C-H Bindungen im Vergleich zu C-Cl oder D-H begünstigt wird [185, 186]. Im Resultat beträgt die 1O_2 -Lebensdauer in D_2O über 60 μ s und EtOH nur knapp 14 μ s. In biologischen und anderen komplexen Systemen kommen weitere Löschprozesse hinzu. Wichtige Beispiele sind hierbei das auf einem Anregungsenergietransfer beruhende physikalische 1O_2 -Quenching durch Natriumazid oder durch Carotinoide. Letztere nehmen im menschlichen Körper eine essentielle Rolle als Antioxidantien ein [187, 188]. Beim chemischen Quenching wird im Gegensatz zur physikalischen Löschung O_2 verbraucht. In organischen Verbindungen dominieren dabei drei Reaktionswege: En-Reaktionen, Cycloadditionen (4+2 sowie 2+2) und Reaktionen an

einem Heteroatom. In biologischen Systemen kommt es dadurch u. a. zur Schädigung von Membranlipiden, Proteinen und DNS. [189, 190]

In biologischen und anderen komplexen Systemen ist die Zuordnung der beteiligten Quenchingmechanismen und Ratenkonstanten nicht trivial und hängt stark von der Mikroumgebung des PS, also dem Ort der $^1\text{O}_2$ -Generierung, und seiner Diffusion ab. Nach dem zweiten Fickschen Gesetz ist die mittlere quadratische Diffusionslänge dabei proportional zur Diffusionskonstante und Lebensdauer des $^1\text{O}_2$. Die resultierenden Längen betragen wenige zehn bis einige hundert nm. Der unmittelbare Wirkradius des $^1\text{O}_2$ ist damit sehr beschränkt, was von wichtiger Bedeutung für PDT und PDI ist. Den einzigen direkten Zugang zur Kinetik der $^1\text{O}_2$ -Generierung und -Desaktivierung bietet die zeitaufgelöste Messung seiner sehr schwachen Lumineszenz im NIR (Kap. 3.2.3). [191, 192]

2.3 PDI grampositiver und gramnegativer Bakterien

Wegen ihrer besonderen Stellung als Krankheitserreger werden im Folgenden die PDI-relevanten Eigenschaften sowie Unterschiede grampositiver und gramnegativer Bakterien zusammengefasst. Die grundlegenden Wirkmechanismen der PDI lassen sich ebenfalls auf andere Mikroorganismen übertragen.

2.3.1 Aufbau grampositiver und gramnegativer Bakterien

Annähernd alle Bakteriengattungen lassen sich auf Basis der Methode der Gramfärbung in zwei Sorten unter grampositiv und gramnegativ subsummieren. Die Färbedifferenzierung ist durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand bedingt (Abb. 2.3-1).

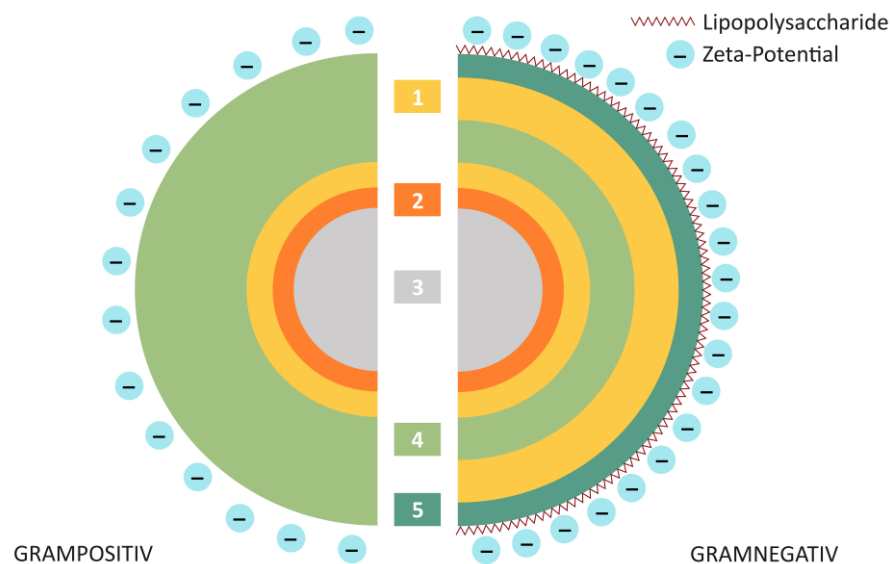


Abb. 2.3-1 Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus grampositiver und gramnegativer Bakterien in physiologischer Umgebung [171]. (1) periplasmatischer Raum, (2) Plasmamembran, (3) Cytoplasma, (4) Murein, (5) äußere Membran.

Bakterien verfügen im Gegensatz zu tierischen Zellen über keinen Zellkern. Erbinformation und Ribosomen liegen frei im Cytoplasma, das durch die Plasmamembran abgeschlossen wird. Dieser ist ein periplasmatischer Raum aufgelagert, der bei grampositiven Bakterien nur noch von einer relativ dicken, aber leicht durchlässigen, Schicht von Murein (ca. 80 nm) und Teichonsäuren ummantelt ist. Bei gramnegativen Bakterien ist die Mureinschicht zwar deutlich dünner (nur ca. 5 nm), wird jedoch von einer zusätzlichen äußeren Membran mit aufgelagerten Lipopolysacchariden und Transportproteinen (Porin-

Kanäle) umgeben. Die äußere Membran stellt eine sehr effiziente physikalische und funktionelle Barriere dar und bedingt die besondere Widerstandsfähigkeit gramnegativer Bakterien gegenüber äußeren Umwelteinflüssen. [193–195] Betrachtet man grampositive und gramnegative Bakterien in physiologischer Umgebung, besitzen beide ein negatives Zeta-Potential. Bei gramnegativen Bakterien fällt es jedoch durch die außen anliegenden Lipopolysaccharide, die einen anionischen Charakter besitzen, wesentlich größer aus [196, 197].

2.3.2 Antibakterielle PDI

Prinzipiell benötigt die PDI kein spezielles zelluläres Target, da die Oxidationsmechanismen unspezifisch verlaufen und bereits eine irreversible von außen initiierte Schädigung der Zellmembran zum Zelltod führen kann [198]. Dennoch bedingen die strukturellen Unterschiede grampositiver und gramnegativer Bakterien eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen PS. Zu bedenken ist hierbei, dass die Sekundärreaktionen der Photosensibilisierung die unmittelbare Beteiligung von Substratmolekülen verlangen und der Wirkradius des $^1\text{O}_2$ sehr klein ist. Somit ist eine kritische Anreicherung des PS innerhalb strukturbildender Elemente der Zelle (z. B. Nucleoid, Zellmembran) oder an ihrer unmittelbaren Oberfläche von grundlegender Bedeutung. Grampositive Bakterien, deren Zellwand nur eine schwache Barriere darstellt und für Moleküle bis 60 kDa durchlässig sein kann, können mit einer Vielzahl an neutralen, anionischen und kationischen PS inaktiviert werden. Bei gramnegativen Bakterien können nur relativ kleine und hydrophile Substanzen mit einem Gewicht unter 0,7 kDa über die Porin-Kanäle aufgenommen werden. Diese Bedingungen werden annähernd von keinem PS erfüllt. Zudem verfügen Bakterien über aktive Mechanismen diese Moleküle über Effluxpumpen wieder hinauszubefördern. Ohne den zusätzlichen Einsatz von Zellwandpermeabilisatoren (z. B. Polymyxine) sind in Suspension somit nur kationische PS dazu in der Lage gramnegative Bakterien zu inaktivieren. Aufgrund ihrer positiven Ladung können sie an die negativ geladene Zellwand gramnegativer Bakterien anlagern und von dort die PDI initiieren. [25, 44, 45, 199–203]

Trotz der großen Diversität von Mikroorganismen, lassen sich die hier aufgeführten Mechanismen auch auf Cyanobakterien, Algen und Pilze übertragen. Ihnen allen gemein ist, dass sie eine negativ geladene Zellwand besitzen, deren Integrität überlebenswichtig ist. [42]

2.4 Photosensibilisatoren für die PDI auf Oberflächen

In diesem Kapitel werden zunächst die in der PDI-Forschung relevanten PS und ihre wichtigsten Eigenschaften zusammengefasst. Im Anschluss folgt eine kurze photophysikalische Charakterisierung der beiden für die vorliegende Arbeit relevanten Porphyrine TMPyP und TPPS.

2.4.1 Anforderungen an die Photosensibilisatoren

Die am häufigsten untersuchten Klassen von PS für die PDI stellen Porphyrine und ihre Strukturverwandten (Chlorine, Phthalocyanine u. a.), Phenothiacine, Xanthene, Fullerene, Phenalen-, Curcumin- und Riboflavinderivate dar [55, 204]. Dabei unterscheiden sie sich in Wirkspektrum (grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien, phototrophe Organismen etc.), und Wirkmechanismus (dominierende Typ-I- oder Typ-II-Photosensibilisierung, Lokalisation). Die allgemeinen Anforderungen an PS für die PDI werden im Folgenden zusammengefasst [55, 205]. Dabei wird die Liste um vier weitere Ansprüche erweitert, wie sie für beständige PDI-aktive Oberflächen zu stellen sind (Punkte sechs bis neun).

1. hohe Extinktion im sichtbaren Lichtspektrum
2. hohe ISC-Quantenausbeute
3. Photostabilität und chemische Stabilität
4. keine Dunkeltoxizität
5. keine/geringe (Photo-)Zytotoxizität gegenüber Säugetierzellen
6. breites Wirkspektrum (über Artgrenzen von Mikroorganismen hinaus)
7. keine Aufnahme in das Zellinnere notwendig
8. Typ-II-Photosensibilisierung
9. Funktionalisierbarkeit von Oberflächen (Gewährleistung einer dauerhaften Immobilisierung)

Besonders gut und umfangreich werden die o. g. Eigenschaften von kationischen Porphyrinen, wie z. B. TMPyP, erfüllt [198, 206]. Dabei ist zu beachten, dass diese Einschätzung auf Untersuchungen in Zellsuspension mit frei gelösten PS basiert. Es ist nicht auszuschließen, dass bei fest immobilisierten PS auf Oberflächen ihre Gesamtladung an Bedeutung verliert, da der Kontakt zur Zellwand schon allein durch ihr Aufliegen gegeben ist. Das erklärt auch die in der

Literatur zu PDI-aktiven Oberflächen dokumentierte Wirkung neutraler und anionischer PS gegen gramnegative Bakterien [101, 106, 114, 207]. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wird im Zuge e-Strahl funktionalisierten Membranen in Kap. 4 neben TMPyP das strukturell und photophysikalisch sehr ähnliche jedoch anionische TPPS mit untersucht.

2.4.2 Die Porphyrine TMPyP und TPPS

Porphyrine, wie das hier verwendete TMPyP und TPPS, zeichnen sich durch ein großes zyklisches π -Elektronensystem aus. Daraus resultieren eine hohe Extinktion im sichtbaren Lichtspektrum und eine starke Spin-Bahn-Kopplung, die eine gute ISC-Quantenausbeute bedingt. Das Absorptionsspektrum wird von einer intensiven Bande im Bereich von 380 bis 450 nm (Soret-Bande) und zwei bzw. vier weiteren Banden (Q-Banden) zwischen 500 und 700 nm dominiert. Die Anzahl der Q-Banden hängt von den Symmetrieeigenschaften des Porphyrinrings ab und wird anschaulich im Vier-Orbital-Modell nach Gouterman erklärt. Die Fluoreszenz ist i. d. R. im Bereich um 600 bis 700 nm und die Phosphoreszenz um 900 nm angesiedelt. [208–211]

Tab. 2.4-1 Zusammenfassung grundlegender Charakteristika der beiden PS. *Lokalisation des Absorptions- bzw. Fluoreszenzmaximums gemäß der Messung in Abb. 2.4-1. Die $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute des TPPS wurde auf Basis zeitaufgelöster $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessungen mit TMPyP als Referenz ermittelt.

	TMPyP	TPPS
Ladung	4 +	4 –
gelöst in	H ₂ O	H ₂ O
Absorptionsmaximum*	423 ± 1 nm	413 ± 1 nm
Fluoreszenzmaximum*	669 ± 3 nm	643 ± 1 nm
Fluoreszenzquantenausbeute	5 % [211]	12 % [212]
$^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute	74 % [213]	62 ± 5 % (TMPyP)

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren des frei gelösten TMPyP und TPPS können Abb. 2.4-1 entnommen werden, weitere relevante Eigenschaften dieser PS der Tab. 2.4-1. Die für Porphyrine ungewöhnlich breiten Fluoreszenzbanden des TMPyP in H₂O werden nach in der Literatur teils kontrovers ge-

fürter Diskussion letztlich auf Energiedissipation durch Bildung von H-Brückenbindungen der Wassermoleküle mit den Stickstoffatomen im Zentrum des Porphyrinrings zurückgeführt. Insgesamt ist die Lage der relativ breiten Fluoreszenzbanden stark von der Mikroumgebung abhängig. Die $Q_x(0,0)$ -Emission kann dabei z. B. zwischen 655 und 675 nm lokalisiert sein, wobei auch eine Umkehrung der Intensitätsverhältnisse der beiden Banden möglich ist. In wässriger Salzlösung oder organischen Lösemitteln sind die beiden Banden i. d. R. deutlich ausgeprägt mit einem $Q_x(0,0)$ -Maximum zwischen 653 und 656 nm. [208, 211, 212, 214–218]

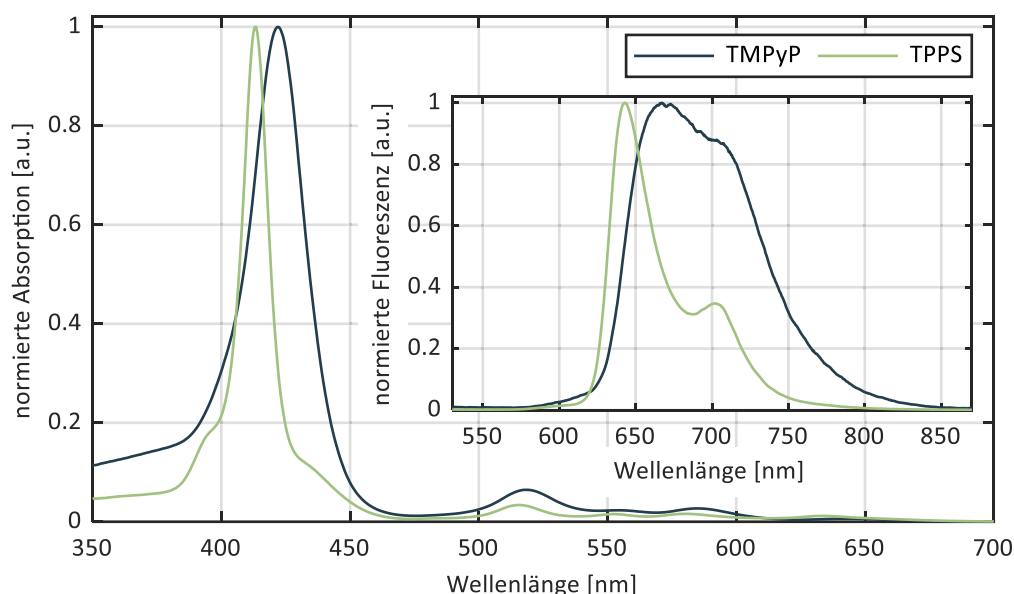


Abb. 2.4-1 Auf die jeweiligen Maxima normierten Absorptions- und Fluoreszenzspektren von TMPyP und TPPS in H_2O . Die grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften können der Tab. 2.4-1 entnommen werden.

Das vierfach kationische TMPyP bildet einen der prominentesten Vertreter der für die PDI in Suspension untersuchten PS, dessen Wirksamkeit für eine Vielzahl von gramnegativen und grampositiven Bakterien nachgewiesen wurde [58, 59, 219–221]. Dem TPPS, das in der Struktur dem TMPyP verwandt aber vierfach anionisch ist (Abb. 3.1-1), wird hingegen nur in wenigen Publikationen eine phototoxische Wirkung auf Mikroorganismen zugeschrieben, wobei sich diese auf grampositive Bakterienstämme beschränkt [84, 87, 222].

Kapitel 3:

Materialien und Untersuchungsmethoden

3.1 Verwendete Photosensibilisatoren und Bakterienstämme

3.1.1 Photosensibilisatoren

3.1.2 Bakterienstämme

3.2 Methoden

3.2.1 PS-Nachweis mit diffuser Reflexionsspektroskopie im UV-VIS

3.2.2 Ortsaufgelöster Nachweis der PS-Fluoreszenz und $^1\text{O}_2$ -Generierung

3.2.3 Auswertung der NIR-Lumineszenzkinetik

3.2.4 PDI-Versuche

3.2.5 Ergänzende Charakterisierung: Stationäre Absorption und Fluoreszenz

3.2.6 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer PS-Extraktion durch Bakterien

3.1 Verwendete Photosensibilisatoren und Bakterienstämme

Im Folgenden werden die für die Oberflächenfunktionalisierung verwendeten PS und die für PDI-Versuche verwendeten Bakterienstämme aufgelistet. Die Oberflächen selbst und ihre Funktionalisierung werden in den entsprechenden Ergebniskapiteln (Kap. 4.1 und 5.1) beschrieben, da sie für sich abgeschlossene Untersuchungssegmente darstellen.

3.1.1 Photosensibilisatoren

Für die e-Strahl-Funktionalisierung der Mikrofiltrationsmembranen wurden die zwei symmetrischen Porphyrine TMPyP und TPPS verwendet. Für die Funktionalisierung der Textilien wurde ausschließlich TMPyP, bzw. ein einfach substituiertes TMPyP-Derivat verwendet, im Folgenden TriMPyP genannt. Beim TriMPyP ist einer der vier Pyridinringe durch einen Benzolring mit COOH-Rest substituiert, wodurch eine kovalente Anbindung des PS nach Aktivierung der Säure ermöglicht wird. Die Strukturformeln der drei PS können nachstehender Abbildung entnommen werden (Abb. 3.1-1). Alle drei PS sind kommerziell erhältlich, ihre vollständigen Bezeichnungen lauten:

TMPyP

5,10,15,20-Tetrakis-(1-Methyl-4-Pyridinio)-Porphyrin Tetra-p-Toluensulfonat, CAS 36951-72-1, erworben bei der TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Molare Masse: 1364 g/mol

TPPS

5,10,15,20-Tetrakis-(4-Sulfonatphenyl)-21,23H-Porphyrin Tetrahydrat, CAS 35218-75-8, erworben bei der ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Molare Masse: 935 g/mol

TriMPyP

5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-Tri-(1-Methyl-4-Pyridinio)-Porphyrin Trichlorid, CAS 211360-21-3, erworben bei der PorphChem SAS, Dijon, Frankreich
Molare Masse: 813 g/mol

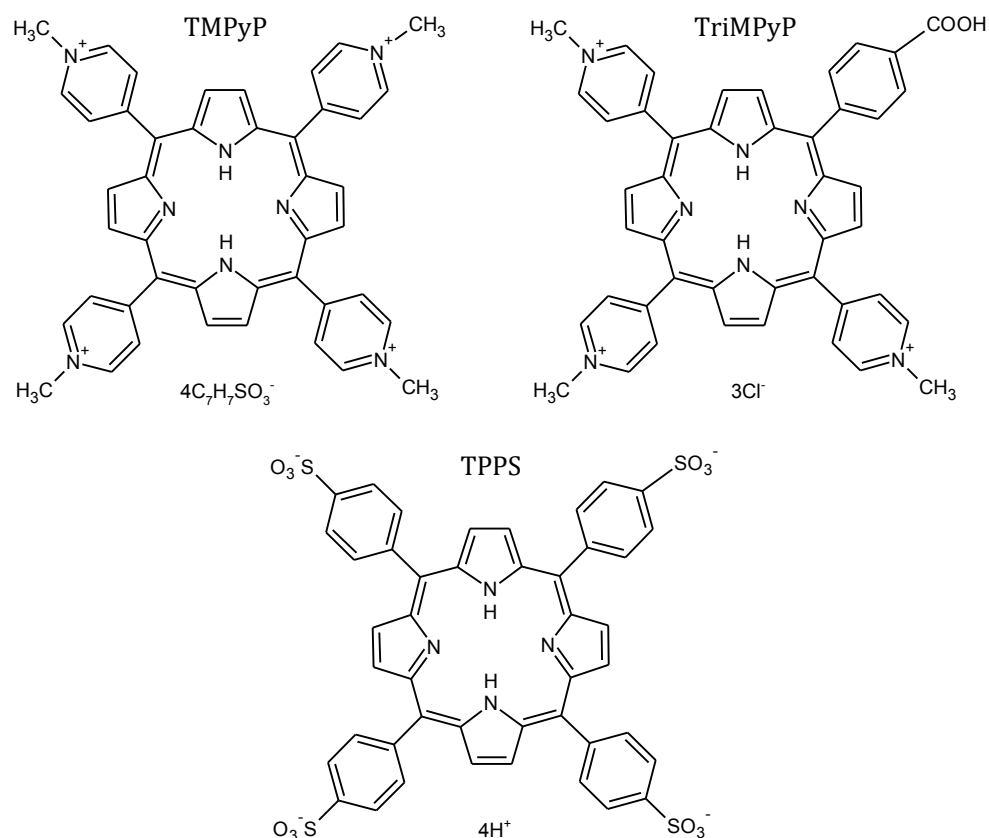


Abb. 3.1-1 Strukturformeln der für die Funktionalisierungen verwendeten PS-Salze. TMPyP ist vierfach kationisch, TPPS vierfach anionisch, TriMPyP dreifach kationisch.

3.1.2 Bakterienstämme

Für Bakterienversuche zur Ermittlung der PDI-Aktivität der funktionalisierten Oberflächen wurden ein *Escherichia coli* (*E. coli*) Wildtyp (Typus ATCC 25922) und ein aus Luftkeimproben isolierter *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) verwendet. Der *E. coli* gilt als Modellbakterium der gramnegativen Bakterien [223] und ist einer der wichtigsten Vertreter nosokomialer Infektionen [224]. Der *M. luteus* ist ein grampositives Bakterium, das ubiquitär vorkommt. Damit ist er einer der am leichtesten einzufangenden und zu kultivierenden Keime. Sein Wachstum auf Nährböden ist durch die Bildung gelb pigmentierter Kolonien leicht zu identifizieren. Außerdem handelt es sich um ein obligat aerobes Bakterium, das seine gelbe Färbung der Bildung von Carotinoiden, effiziente 1O_2 -Quencher [225], verdankt. Das macht es als grampositives Zielbakterium für die PDI besonders interessant.

3.2 Methoden

Die im Zuge dieser Arbeit systematisierte Methodologie sieht drei essentielle aufeinander aufbauende Untersuchungssegmente vor, die von drei Untersegmenten ergänzt werden (Abb. 3.2-1). Dabei wird mit dem Nachweis einer erfolgreichen PS-Dotierung des Substrates begonnen. Dieser wird neben einer ersten visuellen Begutachtung (Einfärbung des Substrates im Vergleich zu einer ungefärbten *Nullprobe*) mittels orts aufgelöster Fluoreszenzmessungen und Messungen der diffusen Reflexion im UV-VIS (DRUV) geführt. Auf Basis der DRUV- und Fluoreszenzspektren können sowohl der PS und seine relative Menge als auch mögliche Wechselwirkungen mit seiner Mikroumgebung identifiziert werden. Daraus können Rückschlüsse auf eine mögliche Aggregation oder gar Zerstörung des PS gezogen werden [226, 170]. Bereits eine PS-Aggregation kann zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz- [227, 228] und $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute führen [229]. Die orts aufgelöste Darstellung erlaubt eine zur visuellen Begutachtung ergänzende Einschätzung zur Homogenität der Färbung und damit auch Immobilisierungsstabilität des PS. Im nächsten Schritt wird der direkte Nachweis der $^1\text{O}_2$ -Generierung des funktionalisierten Materials auf Basis der charakteristischen NIR-Lumineszenz durchgeführt. Wie sich im Verlauf der Arbeit herausstellen wird, erlaubt die Erfassung der Lumineszenzkinetik in Kombination mit einer gezielten Manipulation der Mikroumgebung Rückschlüsse auf die biologische Wirksamkeit der Proben. Erst nach erfolgreicher Durchführung dieses Arbeitsschrittes sind zeit-, material- und kostenaufwendigen PDI-Versuche mit Mikroorganismen sinnvoll. Diese werden auf Basis von quantitativen und semiquantitativen Tests der Phototoxizität unter definierten Bestrahlungsbedingungen durchgeführt.

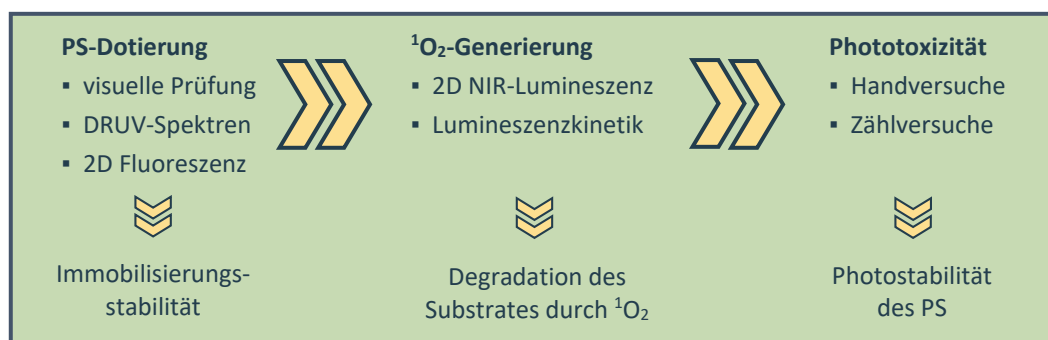


Abb. 3.2-1 Diagramm der grundlegenden Methodik zur Charakterisierung PDI-aktiver Polymeroberflächen mit drei Haupt- und drei Untersegmenten.

Nach Bestätigung der $^1\text{O}_2$ -Generierung und Phototoxizität der Proben können ergänzend die Untersegmente des Methodendiagramms durchgeführt werden. Die Bewertung der Immobilisierungsstabilität kann auf Basis von Extraktionsversuchen mit diversen Lösemitteln aber auch mit Bakteriensuspension erfolgen. Zur Gewährleistung einer Langzeitstabilität der funktionalisierten Oberflächen sind außerdem Untersuchungen zu einer möglichen Substratdegradation durch den generierten $^1\text{O}_2$ [180, 191, 230, 231] und Photostabilität des PS [232–235] notwendig. Diese sind Substrat- und Anwendungsspezifisch (z. B. Bestrahlungsmodalitäten während der PDI – dauerhaft/periodisch, trockene/feuchte Umgebung) durchzuführen.

3.2.1 PS-Nachweis mit diffuser Reflexionsspektroskopie im UV-VIS

Spektren der diffusen Reflexion im UV-VIS (DRUV) auf den funktionalisierten Proben wurden mit einem Absorptionsspektrometer (UV-2450, Shimadzu Deutschland GmbH) mit Ulbricht-Kugel-Aufsatz (ISR-240A, ebenfalls Shimadzu) aufgenommen. Der empfindliche Wellenlängenbereich beträgt 240 bis 800 nm. Bei einer DRUV-Messung wird das relative Reflexionsvermögen R einer festen Oberfläche zu einem Standard gemessen, das im Fall einer ideal diffusen Reflexion an einer unendlich dicken Schicht als Remissionsgrad R'_∞ bezeichnet wird. Aus der Wellenlängenabhängigkeit des Remissionsgrades kann ein scheinbares Absorptionsspektrum des adsorbierten Farbstoffes abgeleitet werden. Als Standard wird im Idealfall – wie auch bei einer gewöhnlichen Absorptionsmessung üblich – das gleiche Substrat nur ohne PS verwendet. Für die Darstellung der DRUV-Spektren wird im Folgenden die Kubelka-Munk-Funktion $F(R'_\infty)$ herangezogen, die eine lineare Abhängigkeit der Volumenkonzentration c des adsorbierten Farbstoffes und des in der Kubelka-Munk-Theorie definierten Absorptionskoeffizienten K herstellt [236, 237]:

$$F(R'_\infty) \equiv \frac{(1 - R'_\infty)^2}{2R'_\infty} = \frac{K}{S} \sim \frac{\varepsilon c}{S} \quad (1)$$

S und ε bezeichnen dabei den Streukoeffizienten der Oberfläche bzw. Extinktionskoeffizienten des PS. Die Linearität der Beziehung gilt nur für kleine Konzentrationen des Adsorbens und große Standardoberflächen, d. h. vernachlässigbare Wechselwirkungen der adsorbierten Farbstoffmoleküle mit ihrer Um-

gebung, und kann als Pendant zum Lambert-Beer'schen Gesetz auf Oberflächen gesehen werden. Eine strenge Quantifizierung der PS-Menge ist aber i. d. R. nur unter Einbeziehung einer Eichkurve der gleichen Substrate mit bekannter PS-Dichte möglich. [238, 239] Die dafür zu erfüllenden Bedingungen sind für die hier untersuchten Proben, wenn überhaupt, nur mit hohem Aufwand realisierbar, sodass sich die DRUV-Spektren ausschließlich auf eine qualitative bzw. semiquantitative Auswertung beschränken.

3.2.2 Ortsaufgelöster Nachweis der PS-Fluoreszenz und $^1\text{O}_2$ -Generierung

Der Aufbau des Scanmessplatzes zur ortsaufgelösten Messung von Fluoreszenzspektren und zeitaufgelösten NIR-Lumineszenz ist detailliert in der Dissertationsschrift von Tobias Bornhütter dargestellt [240]. Dieser erlaubt eine zweidimensionale Rasterung plan-ebenen Oberflächen mit einer maximalen Auflösung von 0,2 mm. Das Herz der zeitaufgelösten NIR-Detektion bildet eine von Jan C. Schlothauer und Steffen Hackbarth entwickelte Messarchitektur zur zeitkorrelierten Multiphotonenzählung (*time-correlated multi photon counting*, kurz TCMPC) [241, 154], die eine Erweiterung der aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie bekannten Einzelphotonenzählung (TCSPC) [242] darstellt. Der Messplatz lässt sich in vier Segmente unterteilen, die im Folgenden einzeln beschrieben werden.

Die Anregung erfolgt mit einem pulsfrequenzmodulierbaren Diodenlaser (LDM405D, Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH). Seine Emissionswellenlänge beträgt 405 nm und die maximale Durchschnittsleistung 1,2 W. Die Frequenzmodulation des Anregungspulses wird durch die TCMPC gesteuert. Die TCMPC basiert auf einer 12-Bit-Architektur (4096 Kanäle) mit einer maximalen Zeitauflösung von 20 ns (Kanalbreite), weitere implementierte Kanalbreiten sind 40 und 80 ns. Die Standardpulsbreite des Anregungspulses beträgt 240 ns. Die resultierende Pulsenergie des Systems beträgt damit ca. 0,3 μJ /Puls bzw. gemittelt 3,5 mW bei einer Kanalbreite von 20 und 0,9 mW bei einer Kanalbreite von 80 ns.

Die Probenrasterung erfolgt auf einer in x- und y-Richtung verfahrbaren Probenhalterung mit einer Weglänge von maximal 25 cm und einer Verfahrensgenauigkeit von 20 μm . Die Detektionsoptik ist in z-Richtung verfahrbar montiert

mit einer maximalen Weglänge von 4,5 cm bei einer Genauigkeit von 10 μm . Die Detektion erfolgt mittels Fasereinkopplung (600 μm Faser für Fluoreszenz und 2000 μm Faser für NIR-Lumineszenz) im 40°-Winkel zur Anregung mit einem Abbildungsmaßstab von 1:6. Bei einer optimalen Fokussierung des Anregungsstrahls wird das Auflösungslimit durch das Anregungsvolumen bestimmt, das einen Durchmesser von ca. 100 μm aufweist. Durch Streuung an der Probenoberfläche wird das resultierende Auflösungsvermögen von ca. 0,23 mm/Pixel (Nyquist-Kriterium) i. d. R. größer ausfallen. Durch die schräg zueinander angeordneten optischen Achsen der Anregung und Detektion werden zwar einerseits Streueffekte minimiert. Andererseits erfordert das System eine sehr genaue Justage und möglichst plan-ebene Probenoberflächen. Um das bei den hier untersuchten plastischen Textil- und Membranmaterialien gewährleisten zu können, wurden die Probenoberflächen durch Auflegen einer 5 mm dicken Quarzglasscheibe eingeebnet. Quarzglas ist zwar im untersuchten Bereich spektral inert, jedoch verlieren die Gesamtsignale dabei ca. 50 % an Intensität.

Die Fluoreszenz wird durch ein Faserspektrometer (C10083CAH, Hamamatsu Photonics K.K.) detektiert. Sein Empfindlichkeitsbereich liegt bei 320 bis 1000 nm mit einer Auflösung von 1 nm. Zur Minimierung von Streuartefakten durch den Anregungslaser wird ein Cut-Off-Filter bei 450 nm verwendet.

Die Detektion der NIR-Lumineszenz erfolgt durch einen PMT-Detektor (H10330, Hamamatsu Photonics K.K.). Sein Empfindlichkeitsbereich liegt zwischen 950 und 1400 nm mit einer nominellen Quanteneffizienz von 2 % bei 1270 nm und einem Dunkelrauschen von 2500 s^{-1} . Damit ist er der zurzeit empfindlichste NIR-Detektor für die Messung von $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignalen [243]. Für die hier durchgeführten Messungen wurden zwei Detektionsoptiken verwendet. Eine Optik bei 1270 ± 20 nm (FWHM resp. *full width at half maximum*), die für den Spektralen Bereich der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz optimiert ist, und eine Optik bei 1200 ± 15 nm (FWHM). Letztere dient der Möglichkeit einer nachträglichen Signalkorrektur durch Identifikation der PS-Phosphoreszenz oder anderer Störsignale.

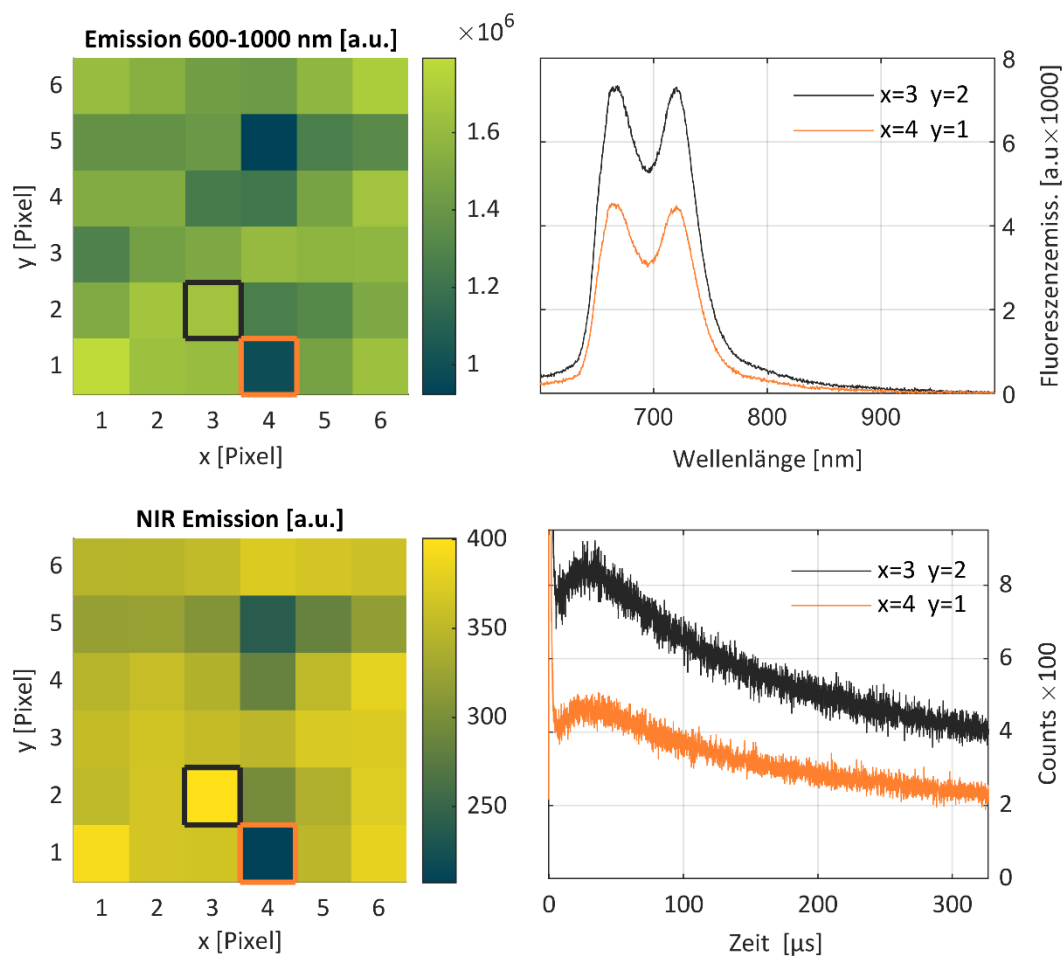


Abb. 3.2-2 Beispielhafte Darstellung einer ortsaufgelösten Fluoreszenz- (oben) und NIR-Lumineszenzmessung (unten). Links: Ortsaufgelöste Darstellung der Fluoreszenz- und NIR-Lumineszenz-Scans (1270 ± 15 nm FWHM) einer mit TMPyP funktionalisierten Textilprobe. Rechts: Messsignale der farblich entsprechend hervorgehobenen Pixel im 2D-Scan. Es wurden die Pixel mit dem stärksten und dem schwächsten Gesamtsignal markiert.

In Abb. 3.2-2 sind beispielhaft 2D-Scans der Fluoreszenz und NIR-Lumineszenz auf einer Probenoberfläche in einem typischen 6×6 Pixelraster à 1 mm Schrittweite dargestellt. Bei homogener Probenfunktionalisierung sind dabei für die Auswertung nur die mittleren Werte der PS-Fluoreszenz und die Gesamtsignale der zeitaufgelösten NIR-Lumineszenz von Interesse. In den 2D-Scans selbst erfolgt für die Fluoreszenz eine pixelweise Signalintegration im typischen Emissionsbereich des PS (600 bis 1000 nm). Der Messfehler wird durch die Standardabweichung der einzelnen Pixel und einem Probenspezifischen Justagefehler, der von ihren Streueigenschaften abhängt, abgeschätzt.

Die NIR-Emission der 2D-Darstellung wird grob auf Basis der mittleren Count-rate in den ersten 1000 und den letzten 50 Kanälen abgeschätzt – ist aber nur für die hier erfolgte Visualisierung, nicht die im Weiteren durchgeführte Auswertung, von Interesse.

3.2.3 Auswertung der NIR-Lumineszenzkinetik

Im einfachsten Fall der $^1\text{O}_2$ -Generierung und -Desaktivierung in einer homogenen Mikroumgebung wird die Zeitabhängigkeit der $^1\text{O}_2$ -Konzentration $[^1\text{O}_2](t)$ durch ein bi-exponentielles Modell beschrieben:

$$[^1\text{O}_2](t) = N \cdot \Phi_{\Delta} \cdot \frac{\tau_{\Delta}}{\tau_{\Delta} - \tau_T} (e^{-t/\tau_{\Delta}} - e^{-t/\tau_T}) \quad (2)$$

Dabei stehen τ_T und τ_{Δ} für die PS-Triplett-Lebensdauer bzw. die $^1\text{O}_2$ -Lebensdauer und Φ_{Δ} für die $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute nach Anregung von N PS-Molekülen. Die Herleitung dieser Gleichung ist in der Literatur eingehend beschrieben [170, 244, 132, 245] und lässt sich unter einigen vereinfachenden Annahmen, wie sie für die meisten Porphyrine zutreffen (z. B. Vernachlässigung der T₁-Desaktivierung ohne O₂-Beteiligung), aus dem in Abb. 2.2-1 dargestellten Jablonski-Diagramm ableiten. Wegen der geringen Lumineszenz-Quantenausbeute von $^1\text{O}_2$ ist die $^1\text{O}_2$ -Konzentration zu jedem Zeitpunkt proportional zur $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz, sodass der Zeitverlauf der Intensität $I(t)$ einer $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessung ohne Störsignale (z. B. PS-Phosphoreszenz) wie folgt beschrieben wird:

$$I(t) = A \cdot (e^{-t/\tau_r} - e^{-t/\tau_d}) + O \quad (3)$$

Die Amplitude fasst die Vorfaktoren der Gl. (2) zusammen und der Offset berücksichtigt die Dunkelcounts des Messaufbaus. Die Zeitkonstanten τ_r und τ_d stehen für das An- (*raise*) bzw. Abklingen (*decay*) des Signals. Dabei entspricht τ_r der kürzeren, τ_d der längeren Zeit, wie aus einem Vergleich der beiden Gleichungen (2) und (3) klar wird. Ihre Zuweisung zu τ_T bzw. τ_{Δ} ist nicht ohne weiteres möglich und muss anhand ergänzender Messungen wie Flash-Photolyse oder mittels Variation der Sauerstoffkonzentration bestimmt werden [246, 247].

Bereits in unwesentlich komplexeren System mit nur zwei nicht miteinander wechselwirkenden Mikroumgebungen gelingt die mathematische Beschreibung zwar durch einen einfachen Superpositionsansatz, die entsprechende Anpassung des gemessenen Lumineszenzsignals und Zuweisung der vier Abklingzeiten und ihrer Vorfaktoren ist jedoch nicht mehr trivial. Grund ist das allgemein bekannte Problem der Korrelation von Amplituden und Exponenten in der Ausgleichsrechnung [248–250]. Im Resultat ist eine sehr genaue Kenntnis der untersuchten Systeme einerseits (weitere Isolierung einzelner Zeitparameter durch ergänzenden Messungen) und ein hinreichendes SRV andererseits notwendig, wie systematische Untersuchungen mit Computersimulierten Lumineszenzkinetik-Daten zeigen [251, 252]. Deshalb muss bei jeder Kinetikanalyse von $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignalen ein besonderes Augenmerk auf eine konservative Interpretation der Ausgleichsparameter gelegt werden.

Allgemein können in homogener Lösung oder auch Zellsuspension durchgeführte Messungen der zeitaufgelösten NIR-Lumineszenzsignale und ihre Anpassung mittels geeigneter Fitmodelle wichtige Aussagen für die Wechselwirkung des generierten $^1\text{O}_2$ mit seiner Mikroumgebung liefern. Ergänzend können Diffusionsmodelle und Signalsimulationen herangeführt werden [253–255]. Bei den hier untersuchten Polymeroberflächen erweist sich jedoch eine detaillierte Kinetikanalyse mit einer Zuweisung von Lebensdauern als nur bedingt zielführend. Die $^1\text{O}_2$ -Diffusion in Polymeren und wässriger Umgebung kann grob auf zehn bis wenige 100 nm abgeschätzt werden [191], an Raumluft steigt sie weiter um mehr als drei Größenordnungen. In diesem Maßstab bilden die porösen Membranen bzw. Fasergewebe eine isotrope Struktur mit nicht-trivialen Randbedingungen und Phasenübergängen ab. Außerdem ist selbst bei einem SRV größer 100, was aber an den hier vermessenen Systemen zu einem deutlichen Ausbleichen des Signals führt, keine eindeutige Zuweisung von Fitparametern komplexer Abklingmodelle möglich. Einen Ausweg kann eine parametrische Signalanpassung mit einer möglichst kleinen Anzahl an freien Parametern bieten [171]. Hierfür konnten teilweise lediglich um eine einzige dritte freie Abklingzeit erweiterte Fitmodelle der Standardgleichung (Gl. 2) mit hinreichender Güte (Chi-Quadrat-Test und Korrelationsanalysen) herangeführt werden. Im Zuge dieser Signalanpassung zeigten jedoch nur unterschiedliche Inkubationsbedingungen der Oberflächen (trocken, getränkt

mit H₂O, D₂O oder EtOH) auch außerhalb der Unsicherheiten liegende unterschiedliche Fitparameter. Da diese sich aber auch in einer bereits augenscheinlich deutlich nachvollziehbaren Änderung der Signalform widerspiegeln, wird im Folgenden auf eine Angabe von zeitkonstanten weitestgehend verzichtet, zumal diese keiner konkreten Mikroumgebung oder Ratenkonstante zugeordnet werden können.

Somit beschränkt sich die in dieser Arbeit durchgeführte Signalanalyse auf eine triviale Formbeschreibung der über ein Raster von 6 × 6 Pixeln aufsummierten ¹O₂-Signalkinetik. Die Raster der zeitaufgelösten NIR-Lumineszenz werden dabei unter gleichen Bedingungen wie die Fluoreszenzscans aufgenommen und für unterschiedliche Inkubationsbedingungen (trockene und mit Wasser getränkte nasse Proben) verglichen. Wenn nicht anders angemerkt, wurden die dargestellten ¹O₂-Signale zuvor anhand von Referenzmessungen bei 1200 ± 15 nm (FWHM) untergrundkorrigiert. Dieser stark vereinfachte Ansatz verfolgt zwei Ziele: Erstens, soll analog zu Fluoreszenzscans geprüft werden, ob nach Immobilisierung die Fähigkeit der PS ¹O₂ zu generieren erhalten bleibt. Zweitens, soll der Signalvergleich nass und trocken vermessener Proben aufzeigen, ob die PS so im Material immobilisiert wurden, dass der Generierte ¹O₂ überhaupt dazu in der Lage ist an Bakterien zu diffundieren und nicht schon vorher innerhalb des Substrates gequenchet wird.

3.2.4 PDI-Versuche

Die Durchführung der PDI-Versuche zur Bewertung der phototoxischen Wirkung der funktionalisierten Membran- und Textiloberflächen erfolgte in drei Schritten: Ansetzen einer frischen Bakterienkultur aus einem der beiden verwendeten Bakterienstämme (Kap. 3.1.2) und Probeninokulation mit einer definierten Menge der Bakterien, Durchführung der PDI unter definierten Beleuchtungsbedingungen, Quantifizierung der PDI-Wirkung. Für die Versuche wurden die Proben in vier Gruppen eingeteilt: (1.) Bestrahlte PS-dotierte Proben unter definierten Bestrahlungsbedingungen mit einer gruppeneigen entwickelten Beleuchtungsanlage, (2.) gleichbehandelte aber unbestrahlte Dunkelkontrollen sowie (3.) bestrahlte und (4.) unbestrahlte Nullproben (analoge Referenzsubstrate ohne PS-Funktionalisierung). Durch diese Versuchsanordnung ist es möglich die Wirkung der PDI isoliert zu quantifizieren, da sowohl

eine nicht photodynamisch vermittelte Phototoxizität (also generelle Lichtempfindlichkeit der Mikroorganismen) als auch mögliche Dunkeltoxizität der Proben identifiziert werden können. Die Ermittlung der PDI-Wirkung wurde entweder semiquantitativ durch visuelle Einschätzung der Bakterienkolonisation oder quantitativ mittels eines Plattenauszahlverfahrens durchgeführt. Alle Phototoxizitätsversuche wurden an wahlweise mit 70-prozentigem EtOH desinfizierten oder e-Strahl-sterilisierten Proben unter sterilen Bedingungen durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

Kultivierung der Bakterien und Inokulation der Proben

E. coli wurden aus einer Cryokultur in frischem LB-Medium⁹ bei 37 °C angesetzt und drei bis vier Stunden später in ihrer exponentiellen Phase weiterverarbeitet. Dafür wurde die LB-Suspension abzentrifugiert (10 min bei 800 g), dekantiert und die Bakterien in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Medium) resuspendiert. Die Bakteriendichte wurde photometrisch auf eine Größe von ca. 1×10^8 koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml eingestellt.

M. luteus wurden aus einer frischen Luftkeimprobe isoliert und über zwei bis drei Tage auf LB-Agar kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien mit einer Impföse in PBS überführt, homogenisiert und direkt weiterverarbeitet. Die Bakteriendichte wurde mithilfe einer Zählkammer auf ca. 1×10^8 Einheiten/ml eingestellt.

Die Inokulation der Membran- und Textilproben erfolgte mit einem definierten Suspensionsvolumen und wurde so gewählt, dass eine gleichmäßige Benetzung bei vollständiger Aufnahme der Flüssigkeit sichergestellt werden konnte. Dabei betrug das Volumen 30 µl für die quadratischen Textilproben (Probenfläche von ca. 250 mm²) und 10 bzw. 200 µl für die runden Membranen (Probenfläche von ca. 80 bzw. 1700 mm² der beiden verwendeten Membrangrößen mit 10 oder 47 mm Durchmesser).

Beleuchtungsanlage für PDI-Versuche

Für die Durchführung der PDI wurde eine gruppeneigene Beleuchtungsanlage mit Weißlicht-LEDs verwendet. Diese ist für die PDI optimiert und erlaubt eine

⁹ *Lysogeny broth* (LB) Nährmedium bestehend aus 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl mit einem pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ (Carl Roth GmbH&Co. KG, Artikelnr. X968).

effiziente Anregung von PDI-relevanten PS ausschließlich im spektralen Bereich zwischen 400 und 800 nm [256, 171]. Die Anlage (Abb. 3.2-3) besteht aus einem Metallgehäuse mit einem darin verbauten 4x4-Array von alternierend angeordneten kalt- (6500 K) und warmweiß (3500 K) LEDs (LUW W5AM-KXKZ-5P7R und LCW W5AM-JKKX-409Q, Osram Opto Semiconductors GmbH). Das Gehäuse wird aktiv gekühlt, sodass eine Probenerwärmung weitestgehend verhindert werden kann. Durch die Verwendung einer Milchglasplatte herrschen homogenen Beleuchtungsbedingungen. Das Emissionsspektrum der Anlage kann Abb. 3.2-4 entnommen werden [257]. Um die PDI photonenecht abzubilden [258], wurde der relative Überlapp von PS-Absorption und LED-Emission berücksichtigt und die stufenlos regulierbare Beleuchtungsintensität für unterschiedliche PS angepasst. Die maximale Intensität der Anlage beträgt $11 \pm 2 \text{ mW/cm}^2$, die Beleuchtungsfläche $14 \times 14 \text{ cm}$.

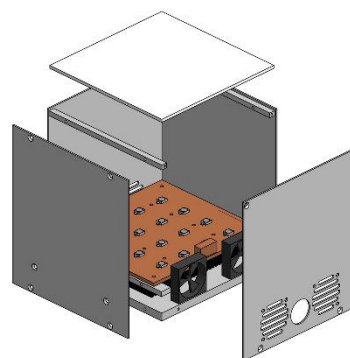


Abb. 3.2-3 Technische Zeichnung der Beleuchtungsanlage mit Gehäuse (grau), LED-Array (braun), Milchglas (weiß) und Kühlung (schwarz).

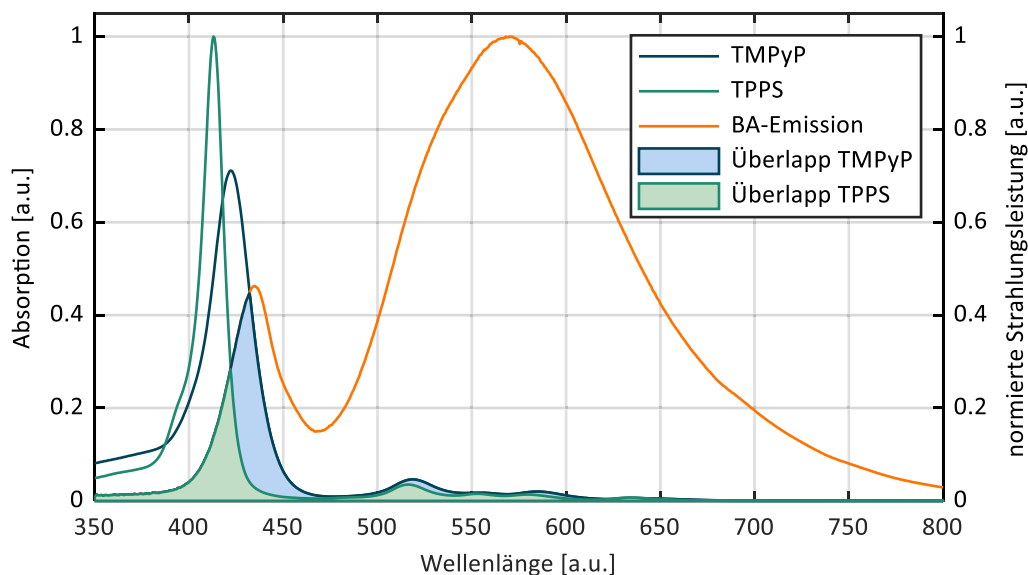


Abb. 3.2-4 Gegenüberstellung der Emission der verwendeten Beleuchtungsanlage (BA) und der beiden PS bei gleicher Konzentration. Die Absorption ist *photonenecht* dargestellt, entspricht hier also der absorbierten Strahlungsleistungsdichte. Im Resultat hat TMPyP einen um Faktor $1,7 \pm 0,1$ größeren spektralen Überlapp mit der BA-Emission als TPPS.

Semiquantitative PDI: Handtests

Bei den Handversuchen bzw. Handtests handelt es sich um eine semiquantitativ durchgeführte visuelle Einschätzung der Zellviabilität. Diese erfolgt i. d. R. zwei bis drei Tage nach Probeninokulation, wenn die Nullproben von einem dichten und gut sichtbaren Bakterienfilm überwuchert sind. Je nach Status der PDI-Wirksamkeit von *„keinerlei Zellkolonisierung sichtbar“* bis *„kein Unterschied im Vergleich zu den Nullproben sichtbar“* kann eine weitere Unterteilung erfolgen. Zur Dokumentation wurden die Proben fotografiert. Die Auswertung selbst erfolgte direkt am Objekt. Diese Versuche wurden mit beiden Bakterienstämmen durchgeführt. Im Gegensatz zu quantitativen Plattenauszahlversuchen sind die Handtests zeit-, material- und kostenschonend.

Quantitative PDI: Plattenauszahlung nach Miles, Misra & Irwin

Laut der Amerikanischen Gesellschaft für Mikrobiologie ist für die Einstufung eines neuen Wirkstoffes oder Verfahrens als antimikrobiell eine Keiminaktivierung von mindestens drei Log_{10} -Stufen (Keimreduktion um 99,9 %) notwendig [52, 259]. Die Plattenauszahlung nach Miles, Misra & Irwin (M&M) ist eine einfache Methode zur Quantifizierung der Zellviabilität in der Größenordnung mehrerer Log_{10} -Stufen [260, 261]. Dafür wird eine Bakteriensuspension in einer Verdünnungsreihe angesetzt und ein definiertes Volumen auf Nährboden ausplattiert. Nach einer ein- bis zweitägigen Inkubation wird die ursprüngliche Lebendzellzahl durch die Zählung von KBE ermittelt (Abb. 3.2-5).

In dieser Arbeit wurden die Versuche wie folgt durchgeführt: Nach Inokulation und Bestrahlung bzw. Dunkelinkubation (Dunkelkontrollen) wurden die Proben für eine Stunde unter Lichtausschluss auf einem Schüttler (200 rpm) in steriler Pufferlösung (1 ml PBS) gewaschen. Der Waschpuffer wurde sechsmal 1:10 verdünnt und jeweils sechs Tropfen à 20 μl jeder Verdünnung auf LB-Agar gebracht. Jede Verdünnung entspricht einer Log_{10} -Stufe (Log_n). Die Agarplatten wurden anschließend für mindestens 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Kolonien manuell ausgezählt. Für jede Probe wurden mindestens 12 Zählungen (mind. zwei gleiche Proben à sechs Zählungen) durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt. Für die Zählungen wurden nur die Tropfen mit deutlich abgegrenzten Kolonien, i. d. R. 1–30 KBE, erfasst. Ausgehend von der ursprünglich auf die Proben gebrachten Bakteriendichte beträgt das Zähllimit dieses Versuches innerhalb der Unsicherheit fünf bis sechs Log_{10} -

Stufen – d.h., wenn alle Bakterien inaktiviert wurden und die Verdünnungsreihen keine zählbaren Kolonien aufwiesen, wurde die relative Zellinaktivierung konservativ auf $\geq \text{Log}5$ gesetzt.

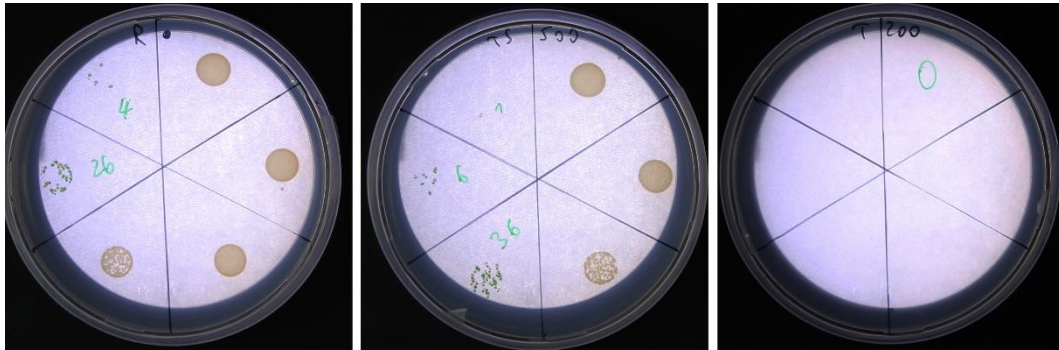


Abb. 3.2-5 Foto zur Illustration eines M&M-Versuchs. Beispielhafte Verdünnungsreihen einer Dunkelkontrolle (links), Probe mit geringem phototoxischen Effekt (Mitte) und Probe mit einem phototoxischen Effekt jenseits des Zähllimits (rechts). Die Verdünnungsreihe beginnt jeweils im rechtsseitigen obersten sechstel und läuft im Uhrzeigersinn durch.

Die quantitative Auswertung konnte nur mit dem *E. coli* durchgeführt werden, da der *M. luteus* sich nicht in ausreichendem Maß von den Substraten lösen ließ. Andere Ansätze einer z. B. photometrischen Viabilitätsmessung, wie das Resazurin- oder MTT-Assay, stellten sich in ihrer Genauigkeit sogar als den hier durchgeführten Handtests unterlegen dar.

3.2.5 Ergänzende Charakterisierung: Stationäre Absorption und Fluoreszenz

Stationäre Absorptionsspektren in Lösung gebrachter PS wurden mit einem UV-1800 Shimadzu UV-VIS-Spektrophotometer aufgenommen. Als Referenz wurde eine analoge Lösung oder Bakteriensuspension ohne PS genutzt.

Die Messung stationärer Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Jasco FP-8000 Fluoreszenzspektrometer. Zur Minimierung von Streuartefakten wurden für Fluoreszenzmessungen, die nicht in Lösung, sondern an festen Oberflächen durchgeführt wurden, zusätzlich zwei Polarisationsfilter für Anregung und Detektion in senkrechter Orientierung verwendet [262, 263].

3.2.6 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer PS-Extraktion durch Bakterien

Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer möglichen PS-Extraktion der funktionalisierten Oberflächen durch Bakterien wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (FluoView FV1000, Olympus K.K.), kurz CLSM, verwendet. Dafür wurden 10 µl einer *E. coli* Suspension (ca. 1×10^8 KBE/ml in PBS) auf einen Objektträger pipettiert und die zu untersuchende Oberfläche aufgelegt. Für die Untersuchung wurde zunächst im Weißlicht ein geeigneter Bildausschnitt mit Bakterien ausgesucht, ein Streulichtbild aufgenommen und anschließend in definierten Zeitabständen die PS-Fluoreszenz im gleichen Bildausschnitt gerastert. Dabei erfolgte die Anregung bei 405 nm und Detektion zwischen 650 und 750 nm. Für den Nachweis der PS-Extraktion durch Bakterien werden Streulicht- und Fluoreszenzbild überlagert dargestellt.

Kapitel 4:

Elektronenstrahl-funktionalisierte Mikrofiltrationsmembranen

- 4.1 Funktionalisierung der Membranoberflächen**
 - 4.1.1 Mikrofiltrationsmembranen
 - 4.1.2 Elektronenstrahlvermittelte Immobilisierung des Photosensibilisators
- 4.2 Physikalische Charakterisierung der funktionalisierten Membranen**
 - 4.2.1 Membrantopologie und Filtereigenschaften nach Elektronenbestrahlung
 - 4.2.2 Einfluss des e-Strahls auf die Immobilisierung des Photosensibilisators
 - 4.2.3 Nachweis der Photosensibilisator-Fluoreszenz auf der Membranoberfläche
 - 4.2.4 Zeitaufgelöste Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz der PS-dotierten Membranen
 - 4.2.5 Extraktionsversuche und Stabilität der Immobilisierung
- 4.3 PDI-Aktivität der funktionalisierten Membranen**
 - 4.3.1 Semiquantitative PDI von Bakterien
 - 4.3.2 Quantitative Zellviabilität nach PDI von *E. coli*
- 4.4 Extraktion des Photosensibilisators durch Bakterien**
- 4.5 Photodegradation und Photostabilität der funktionalisierten Membranen**
- 4.6 Zusammenfassende Bewertung**

4.1 Funktionalisierung der Membranoberflächen

Als Ausgangsmaterial wurden für Anwendungen der Sterilfiltration übliche Mikrofiltrationsmembranen verwendet. Die Mikrofiltrationsmembranen wurden am Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung (IOM) Leipzig in der AG Funktionale Membranen und poröse Polymermaterialien unter der Leitung von Dr. Agnes Schulze funktionalisiert.

4.1.1 Mikrofiltrationsmembranen

Für die e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung wurden kommerziell erhältliche Mikrofiltrationsmembranen aus Polyethersulfon (PES) ausgewählt. PES-Membranen weisen eine hohe chemische und physikalische Beständigkeit auf [139]. Sie gehören dank ihrer hohen Einsatzflexibilität zum Standard der Filtermembrantechnologie [264]. In der Sterilfiltration ist die Verwendung anisotroper PES-Membranen mit einem Gradienten in der Porengröße üblich [265], das ist auch für die hier untersuchten Membranen der Fall. Dabei ist die zum Retentat¹⁰ gewandte Seite größporiger als die zum Permeat gewandte Seite. Dadurch wird ein selektiver Filterprozess ermöglicht und die Lebensdauer der Membranen erhöht [266, 267]. Die Membranen besitzen eine schwammartige Struktur, wobei die Porenbildung i. d. R. durch Phaseninversionsprozesse erreicht wird [265]. In Tab. 4.1-1 sind die Herstellerangaben zu den für die Funktionalisierung verwendeten Mikrofiltrationsmembranen, Millipore Express PLUS, zusammengefasst. Ebenso sind weitere im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelte Angaben aufgeführt. Es wurden Membranen mit einer nominellen Porengröße von 0,22 µm verwendet. Dies ist die gängigste Porengröße in der Sterilfiltration [137]. Es handelt sich dabei um hydrophilisierte Membranen, die eine leichte Wasserbenetzbarkeit aufweisen, wodurch Fouling reduziert und die Durchflussrate erhöht wird. Für die Hydrophilisierung wird das wasserunlösliche PES-Substrat bei der Produktion mit vom Hersteller nicht näher definierten hydrophilen Additiven verschnitten. In der Regel ist es sulfoniertes PES oder Polyvinylpyrrolidon [268, 269]. Durch die leichte Benetzbarkeit wird im Verlauf der e-Strahl-Funktionalisierung eine hohe Ausgangsadsorption der Membranen mit den zu funktionalisierenden

¹⁰ In der Membrantechnik zur Filtration wird vom Retentat als dem zurückgehaltenen Medium und dem Permeat als dem den Filter durchdringenden Medium gesprochen [265].

(wasserlöslichen) PS gewährleistet. Ein weiterer Vorteil ist das erleichterte Herauslösen ungebundener PS durch wässrige Extraktion im letzten Schritt der Funktionalisierung.

Tab. 4.1-1 Herstellerangaben [270] im oberer Tabellenteil und experimentell ermittelte Charakteristika (unten) der in dieser Arbeit für die Funktionalisierung verwendeten Mikrofiltrationsmembranen.

Herstellerangaben	
Porengröße	$\geq 0,22 \mu\text{m}$
Material	PES
Dicke	160 – 185 μm
Durchmesser	47 mm
Porenverteilung und Porosität	asymmetrisch, 70 – 85 %
Benetzbarkeit	hydrophil
Sterilisation	Autoklav (121 °C), EtOH, γ -Strahlung
ergänzende experimentell ermittelte Daten	
Trockengewicht	$82 \pm 2 \text{ mg}$
Wasseraufnahme bei Nasslagerung	max. 300 μl
resultierende mittlere Porosität	$80 \pm 10 \%$

4.1.2 Elektronenstrahlvermittelte Immobilisierung des Photosensibilisators

Die γ - und e-Strahl-vermittelte Veredelung von Polymermembranen und Polymeren ist ein seit über 50 Jahren bekanntes und industriell breit implementiertes Verfahren [271–275]. Dabei wird durch die Bestrahlung sowohl das Substrat als auch das funktionalisierende Molekül (hier die PS TMPyP und TPPS) aktiviert: es entstehen Ionen, angeregte Moleküle und freie Radikale [276], die im weiteren Verlauf zur Vernetzung oder Rekombination zwischen Substrat und PS führen können. Im Idealfall wird dadurch eine kovalente Funktionalisierung erreicht [277]. Es handelt sich somit um ein Einschnitt-Verfahren, bei dem keine chemische Modifikation des Substrates oder der zur

Funktionalisierung verwendeten Moleküle benötigt wird. Im hier vorliegenden Fall werden niederenergetische e-Strahlen in einem wässrigen System verwendet [278].

Tab. 4.1-2 Zusammenfassung der im Folgenden untersuchten Membranproben. R bezeichnet dabei die kommerziell erhältlichen PES-Mikrofiltrationsmembranen (nominelle Porengröße 0,22 µm), die wahlweise nur mit TMPyP oder TPPS gefärbt (T0 bzw. TS0) oder gefärbt und e-Strahl-funktionalisiert (T bzw. TS) wurden. Die PS-Konzentration betrug 1 wt.% in der Funktionalisierungslösung (in H₂O) und entspricht 7 mM für TMPyP bzw. 11 mM für TPPS. Alle Membranen wurden nachträglich viermal mit 5 kGy sterilisiert.

Bezeichnung	PS	Strahlendosis [kGy]	
		Funktionalisierung	Sterilisation
R	–	–	4 × 5
T	TMPyP	200	4 × 5
T0	TMPyP	–	4 × 5
TS	TPPS	200	4 × 5
TS0	TPPS	–	4 × 5

Für die am IOM erfolgte Funktionalisierung wurden die PES-Membranen zunächst für fünf Minuten in 1 % PS-Lösung (Gewichtsprozent im verwendeten Lösemittel – H₂O) gelegt. Diese Konzentration bewegt sich an der Löslichkeitsgrenze von TMPyP in Wasser. Die unmittelbar folgende Bestrahlung der noch nassen Membranen erfolgte auf einer Glasplatte unter Stickstoffatmosphäre (O₂ < 10 ppm) im Niederenergiebereich bei 160 kV und 10 mA, die Energiedosis betrug 200 kGy [279]. Anschließend wurden die Proben 3 × 30 Minuten mit destilliertem (Milli-Q) Wasser gespült, um nicht-immobilisierte PS-Moleküle zu entfernen. Danach wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Wahlweise wurden aus den großen (47 mm Durchmesser) Membranen 10-mm-Scheiben ausgestanzt. Der Membrantransport zur AG Photobiophysik erfolgte lichtgeschützt in PE-Druckverschlussbeuteln, wobei die Membranen zur Sterilisation am IOM nochmals zusätzlich mit 4 × 5 kGy in den Beuteln bestrahlt wurden. Tab. 4.1-2 fasst die Funktionalisierungseigenschaften der untersuchten Mikrofiltrationsmembranen und deren Kurzbezeichnungen zusammen. Letztere werden wahlweise um die Suffixe vs und rs ergänzt, deren Bedeutung im zweiten Absatz des folgenden Abschnitts 4.2 erklärt wird.

4.2 Physikalische Charakterisierung der funktionalisierten Membranen

In diesem Kapitel werden zunächst die grundlegenden PDI-relevanten physikalischen Eigenschaften der funktionalisierten Mikrofiltrationsmembranen erfasst. Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es herauszufinden, ob die e-Strahl-Funktionalisierung die PS-Moleküle auf der Membranoberfläche immobilisiert, ob diese Immobilisierung kovalent ist [276, 277, 279, 280], die PS-Moleküle intakt bleiben und ihre Photoaktivität beibehalten. Da die e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung keinem streng definierten Bindungsmechanismus folgt, können *a priori* nur bedingt Annahmen bezüglich der zu erwartenden Immobilisierung des kationischen TMPyP und des anionischen TPPS getroffen werden. Aufgrund der negativen Oberflächenladung der hier untersuchten Membranen [281] ist aber von einer größeren TMPyP- als TPPS-Adsorption unmittelbar vor Bestrahlung auszugehen. Somit sollte die TMPyP-Immobilisierung effizienter ablaufen.

Die verwendeten kommerziellen Membranen weisen einen Gradienten in der Porengröße mit einer großporigen *matten* und einer kleinporigen *glänzenden* Seite auf. Zu berücksichtigen ist, dass die kleinporige Seite eine geringere Porosität (s. Tab. 4.1-1), also auch einen höheren Material-(PES)-Anteil [266], besitzt. Deshalb ist dort nach der Funktionalisierung eine potentiell höhere PS-Dichte zu erwarten. Ferner ist zu beachten, dass der Elektronenbeschuss im Funktionalisierungsprozess nur von der kleinporigen Seite – im Folgenden *Vorderseite* (vs) erfolgte. Im Gegensatz dazu wird die großporige Seite als *Rückseite* (rs) bezeichnet. Die e-Strahlen sollen das Material vollständig durchdringen [277]. Deshalb wurde für diesen Schritt zunächst von keiner relevanten Vorzugsseite der Membran ausgegangen. Da es bei der Funktionalisierung aber gerade zu Wechselwirkungen zwischen e-Strahlen und Membran kommen soll, kann eine nicht zu vernachlässigende Schwächung des Strahls trotzdem nicht gänzlich ausgeschlossen werden, weshalb die im Folgenden gezeigten photophysikalischen Messungen an beiden Membranseiten durchgeführt wurden, die wahlweise mit vs bzw. rs indiziert werden.

4.2.1 Membrantopologie und Filtereigenschaften nach Elektronenbestrahlung

Im Vorfeld wurden die Membranen am IOM rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 4.2-1). Diese Voruntersuchung bildete den Ausgangspunkt für alle weiterführenden Experimente. Darin konnte gezeigt werden, dass nach der Funktionalisierung die Integrität der Membranstruktur unverändert und somit eine filtertypische Anwendbarkeit erhalten bleibt. Das konnte im Zuge der hier vorliegenden Arbeit mittels Messungen der Durchflussrate mit destilliertem Wasser innerhalb einer Messungenauigkeit von unter 3 % validiert werden (Kap. 4.5).

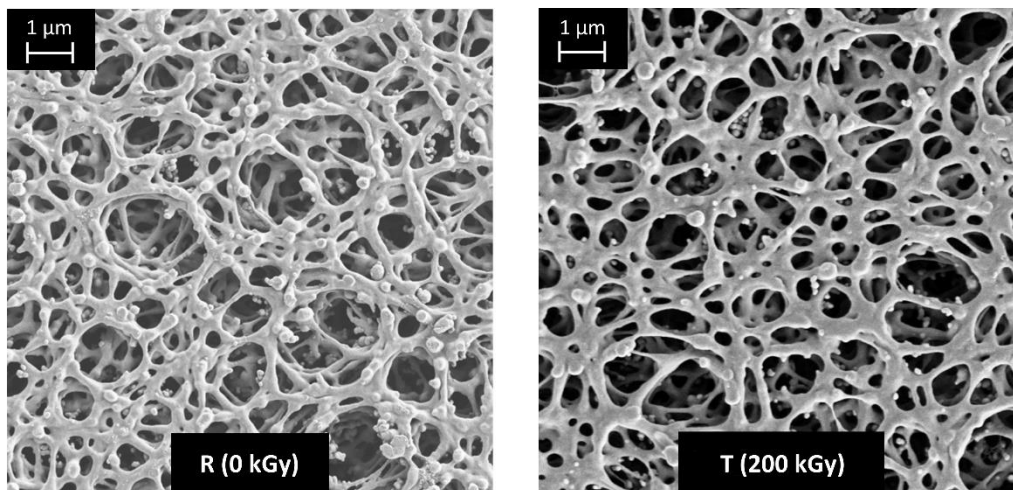


Abb. 4.2-1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der kleinporigen Seiten einer unmodifizierten und unbestrahlten (R) und mit TMPyP bei 200 kGy e-Strahl-funktionalisierten Membran (T). [282]

4.2.2 Einfluss des e-Strahls auf die Immobilisierung des Photosensibilisators

Der visuelle Farbeindruck der mit 200 kGy e-Strahl-funktionalisierten Membranen in Abb. 4.2-2 weist auf eine homogene Einfärbung über die gesamte Membranfläche mit einer PS-Menge von TMPyP (T-Membran) > TPPS (TS-Membran) hin. Ob der unterschiedliche Farbeindruck der T- und TS-Membranen auf spektrale oder absolute Farbunterschiede zurückzuführen ist, kann hier noch nicht hergeleitet werden. Der Vergleich mit den nicht funktionalisierten T0- und TS0-Membranen zeigt keinen Unterschied bei dem TMPyP-

und einen deutlichen Unterschied bei dem TPPS-Farbeindruck. Hier weist die e-Strahl-Funktionalisierung auf keinen Vorteil bei der TMPyP-Ankopplung an die Membranoberfläche hin, der PS scheint lediglich im Material adsorbiert zu sein. Demgegenüber begünstigt die Bestrahlung augenscheinlich eine TPPS-Fixierung. Dabei ist der Farbeindruck der Rückseite der TS-Membran geringer als auf der Vorderseite. Für die T-Membranen ist das nicht der Fall.

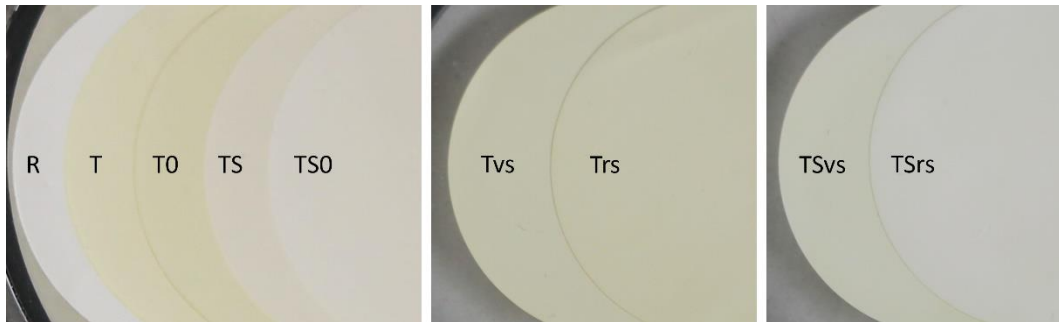


Abb. 4.2-2 Fotos der in diesem Abschnitt untersuchten ungefärbten Referenz-Membranen (R), der mit TMPyP bzw. TPPS gefärbten (T0 bzw. TS0) sowie der gefärbten und e-Strahl-funktionalisierten (T bzw. TS) Membranen. Links: Alle Membranen liegen mit der kleinporigen Vorderseite nach oben. Mitte/rechts: Vergleich der Vorderseite (vs) und der Rückseite (rs) der T- und der TS-Membran.

Die DRUV-Spektren in Abb. 4.2-3 bestätigen grob den visuellen Eindruck der Membranen. Die nach Kubelka-Munk skalierte scheinbare PS-Absorption beträgt im Mittel (vs und rs) $T0 > T > TS > TS0$. Auffällig sind dabei die teilweise drastischen Unterschiede der Signalintensität zwischen Vorder- und Rückseite der Membranen. Dabei fällt sie für die Vorderseite der TPPS-dotierten Membranen höher, für die der TMPyP-dotierten Membranen geringer aus. Die Signalintensität korreliert zunächst nicht mit der Annahme einer höheren PS-Dichte auf der kleinporigen Vorderseite. Ein streng quantitativer Vergleich ist an dieser Stelle jedoch fraglich, da die Vorderseite bei flachen Betrachtungswinkeln sichtbare Glanzspitzen aufweist und sich somit in einem Grenzbereich zwischen regulärer und diffuser Reflexion bewegt. Das bedeutet die Phänomene der Beugung, Streuung und Reflexion sind hier nicht mehr klar definiert und die Annahme einer ideal diffusen Reflexion ist nicht mehr haltbar [238]. Zumindest bei den TS-Membranen kann die deutlich unterschiedliche Einfärbung der Vorder- und der Rückseite aber auch augenscheinlich nachvollzogen werden (Abb. 4.2-2).

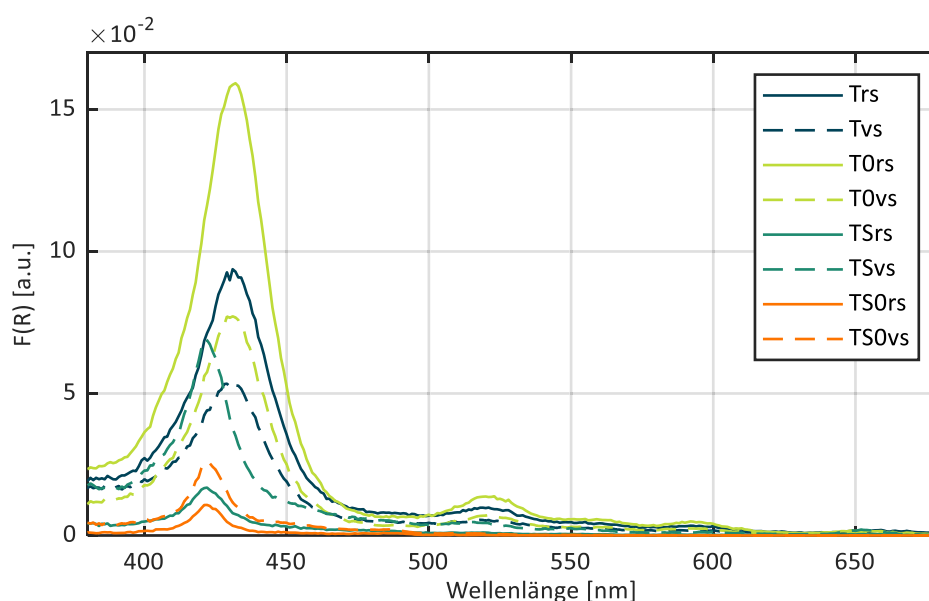


Abb. 4.2-3 DRUV-Spektren (Kubelka-Munk-Darstellung) der Membranoberflächen. Die Reflexion der Vorder- (vs) und Rückseite (rs) der Membranen wurde jeweils gegen die entsprechende Seite einer unbehandelten Referenzmembran als Standard gemessen. Bezeichnungen: TMPyP- (T/T0) und TPPS-dotierte (TS/TS0) e-Strahl-funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte Membran.

Die DRUV-Spektren zeigen bei allen Membranen – mit Ausnahme der TS0-Membran aufgrund eines zu geringen Signals – deutlich die vollständige charakteristische PS-Absorption mit einer Soret-Bande und vier Q-Banden. Dabei sind innerhalb der einzelnen PS keine Unterschiede erkennbar. Die absoluten Maxima der TMPyP-dotierten Membranen liegen bei 431 ± 2 nm und der TPPS-Membranen bei 422 ± 2 nm. Damit weisen die Reflexionsspektren eine Rotverschiebung von 5 bis 10 nm gegenüber den Absorptionsspektren der freien PS auf (Abb. 2.4-1). Diese Verschiebung kann auf eine veränderte Mikroumgebung [217, 283] und, wie z.B. im Fall von TMPyP bekannt, auch auf rein physikalische Adsorption und Interkalation/Einbettung (mit einer Rotverschiebung der Soret-Bande von ≥ 7 nm) zurückgeführt werden [284, 285, 244, 286–289]. Eine Rotverschiebung in den DRUV-Spektren konnte aber auch schon für an Textilsubstrate kovalent gebundene PS [117], darunter auch TMPyP- und TPPS-Derivate [115], und an eSpin-Fasern elektrostatisch gebundenes TMPyP [290] beobachtet werden. Außerdem zeigten eigens mit TMPyP in wässriger Lösung getränkte Referenzmembranen die gleiche Rotverschiebung (hier nicht dargestellt). Da die grundlegende Bandenstruktur der PS-Absorption erhalten bleibt, liefern die DRUV-Spektren keine Hinweise auf eine

veränderte Struktur der PS nach der e-Strahl-Funktionalisierung. Eine Protonierung des Kerngerüsts würde sich z. B. sowohl in einer Rotverschiebung der Soret-Bande als auch Entartung der Q-Banden widerspiegeln [211, 217, 283, 209, 291]. Folglich kann auf Basis der visuellen Einschätzung aus Abb. 4.2-2 in Kombination mit den DRUV-Messungen (Abb. 4.2-3) an dieser Stelle tatsächlich hergeleitet werden, dass die Funktionalisierung eine Fixierung zumindest im Fall des anionischen TPPS, aber nicht des kationischen TMPyP begünstigt. Für die Bewertung der TMPyP-Immobilisierung ist das ausschließliche Auswaschen der Membranen mit H₂O nach der Funktionalisierung scheinbar nicht geeignet. Daher wird auf die Extraktionsversuche in Kap. 4.2.5 verwiesen.

Die oben durchgeführten Abschätzungen hinsichtlich der PS-Immobilisierung durch den Elektronenbeschuss sind zunächst rein qualitativer Natur. Aufgrund der deutlichen Unterschiede zwischen Vorder- und Rückseite der Membranen und den damit einhergehenden Messunsicherheiten ist eine strenge Quantifizierung auf Basis der DRUV-Messungen nicht möglich. Ein weiterer Quantifizierungsansatz, in dem die Membranen in DMSO gelöst und einer anschließenden Absorptions- und Fluoreszenzmessung unterzogen wurden [292], war nur eingeschränkt möglich. Grund waren deutlich sichtbare Schlieren ungelösten Materials mit erhöhter PS-Konzentration. Da dieser Effekt unabhängig von der Funktionalisierung beobachtet wurde, wird er der Membranproduktion zugeschrieben. Dabei kommen entweder eine DMSO-Unlöslichkeit der Additive oder eine zusätzliche Vernetzung, wie sie z. T. ebenfalls verwendet wird [265], infrage. Grob konnte jedoch aus den Absorptionsmessungen eine untere Schranke für die TMPyP-Menge von 100 nmol/g (T und T0) und TPPS-Menge von 60 nmol/g (TS) bzw. 20 nmol/g (TS0) abgeschätzt werden – bezogen auf die Trockenmasse der jeweiligen Membran. Diese Werte liegen in der Größenordnung der von Stanley et al. mit einem ähnlichen Ansatz quantifizierten Funktionalisierung von Porphyrin-dotierten eSpin-fasern [91].

4.2.3 Nachweis der Photosensibilisator-Fluoreszenz auf der Membranoberfläche

Im Folgenden werden die Fluoreszenzsignale der Membranen an der Vorder- und Rückseite verglichen. Unterschiede in der Intensität (Abb. 4.2-4) und spektralen Lage (Abb. 4.2-5) liefern dabei weitere Hinweise zum Einfluss der e-Strahl-Funktionalisierung auf die PS und ihre photophysikalische Aktivität.

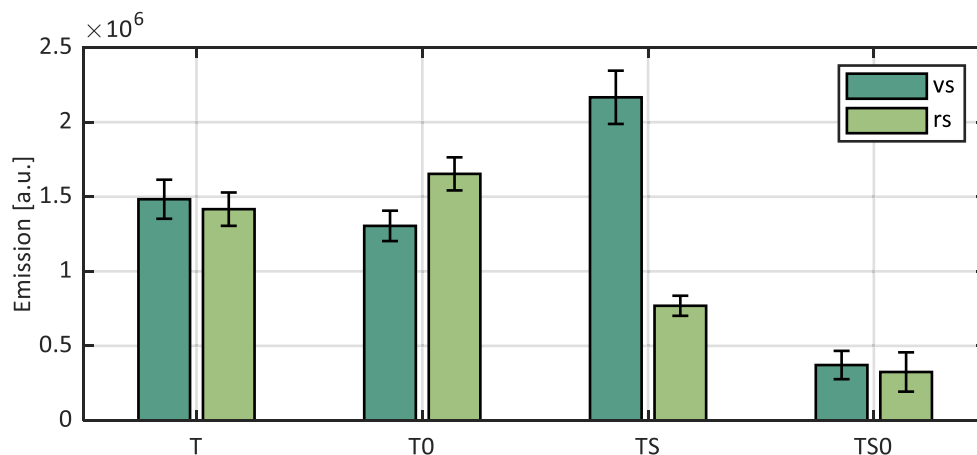


Abb. 4.2-4 Nachweis der PS-Fluoreszenz auf den Membranoberflächen und der Vergleich zwischen ihrer Vorderseite (vs) und Rückseite (rs). Es wurde jeweils die integrierte Gesamtemission von 600 bis 1000 nm über einen Fluoreszenzscan von 6×6 Pixeln (1 mm Schrittweite) gemittelt. Die Fehlerbalken wurden aus der Standardabweichung (n=36) und Justagegenauigkeit abgeschätzt. Bezeichnungen: TMPyP- (T/T0) und TPPS-dotierte (TS/TS0) e-Strahl-funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte Membran.

Das Balkendiagramm in Abb. 4.2-4 stellt die gemittelte Gesamtemission über ein 36-Pixel-Raster im PS-typischen Emissionsbereich zwischen 600 und 1000 nm dar. Die Flächenscans der Membranfluoreszenz zeigen deutliche Fluoreszenzsignale der entsprechenden PS. Dabei wurden die Scans über eine Fläche von 6×6 mm (Schrittweite von 1 mm) in der Mitte der großen (47 mm Durchmesser) Membranen gemittelt. Innerhalb dieses Rasters ist die PS-Emission mit einem Konfidenzintervall von unter 2 % normalverteilt und bestätigt die Homogenität des visuellen Farbeindrucks. Der Gesamtfehler dieser Scans wird durch nicht zu vermeidende zufällige Fehler aus der Justage der Detektionsoptik ergänzt. Aufgrund der sehr geringen Streuung des einfallenden Primärstrahls belaufen sich diese i. d. R. auf maximal 20 % des Gesamtsignals [292] und wurden hier aus drei unabhängigen Messreihen abgeschätzt. Passend zu den Beobachtungen im vorangegangenen Abschnitt (Kap. 4.2.2) gilt für die Signalintensitäten grob $\{T \approx T0\}$ und $\{TS > TS0\}$. Insgesamt zeigen die TS-Membranen rückseitig um etwa den Faktor drei geringere Signale als ihre Vorderseiten. Bei den anderen Membranen sind diese Unterschiede vernachlässigbar. Somit wird auch hier kein systematischer Einfluss der unterschiedlichen Porosität auf die Signalintensität deutlich. Vielmehr erhärtet sich die Annahme, dass die e-Strahl-Funktionalisierung nur auf die TPPS- und nicht die

TMPyP-Fixierung einen messbaren Einfluss hat. Es scheint nicht ausgeschlossen, dass durch eine Schwächung des e-Strahls beim Membrandurchgang rückseitig eine geringere TPPS-Menge fixiert wird.

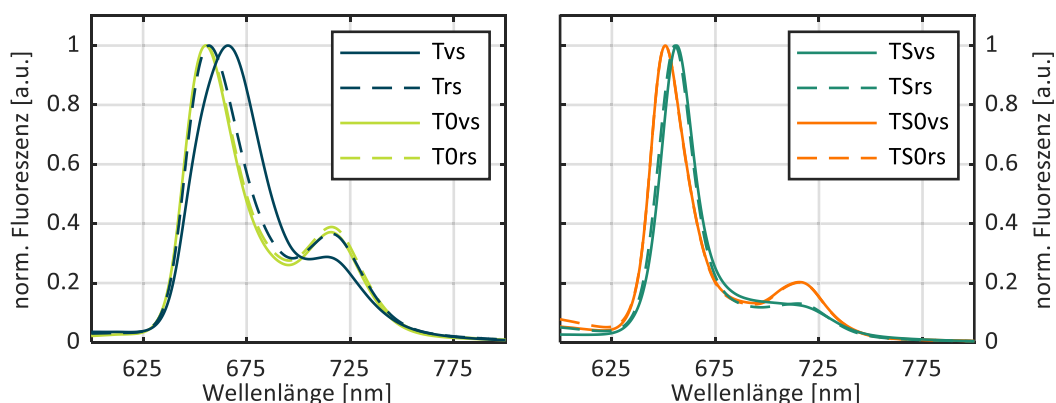


Abb. 4.2-5 Vergleich der normierten Fluoreszenzspektren der Vorder- (vs) und Rückseite (rs) der TMPyP-dotierten (links, T/T0: e-Strahl-funktionalisiert/nicht-funktionalisiert) und TPPS-dotierten (rechts, TS/TS0: e-Strahl-funktionalisiert/nicht-funktionalisiert) Membranen. Die Anregung erfolgte im jeweiligen Soret-Maximum aus den DRUV-Messungen (Abb. 4.2-3).

Für die Bewertung spektraler Unterschiede der Fluoreszenzsignale wurden ergänzend mit einem Desktop-Spektrometer Fluoreszenzspektren der Membranoberflächen aufgenommen und normiert dargestellt (Abb. 4.2-5). Die Anregung erfolgte dabei jeweils im aus den DRUV-Spektren ermittelten Maximum der scheinbaren Absorption. Die normierten Fluoreszenzspektren auf den Membranen weisen im Vergleich zu den frei gelösten PS eine Rotverschiebung von mindestens 5 nm für TPPS-dotierte und eine deutlicher ausgeprägte Bandenstruktur der TMPyP-dotierten Membranen auf. Das ist auf die veränderte Mikroumgebung der PS innerhalb der Membran zurückzuführen [215, 244, 287, 107]. Ein Vergleich zwischen e-Strahl-funktionalisierten und nicht-bestrahlten TPPS-Membranen zeigt eine zusätzliche Rotverschiebung um weitere 5 ± 1 nm der höherenergetischen $Q_x(0-0)$ -Fluoreszenzbande und vergleichsweise geringere Ausprägung der niederenergetischen $Q_x(0-1)$ -Fluoreszenzbande – dies gilt für beide Seiten der TS-Membran. Für die T-Membranen ist von diesem Effekt nur die Vorderseite betroffen, dabei beträgt die Rotverschiebung zusätzliche 10 ± 1 nm. Die Rückseite zeigt weitestgehend einen Überlapp mit den Spektren der T0-Membranen. Diese Zusammenhänge konnten in 3D-Anregungsspektren (hier nicht gezeigt) als unabhängig von der Anregungswellenlänge bestätigt werden und weisen auf Unterschiede in der

Mikroumgebung und folglich eine Beteiligung anderer Kopplungsmechanismen hin. Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis auf den Einfluss der Bestrahlungsseite bei der Funktionalisierung, hier jedoch nur für die TMPyP-Membranen. Inwiefern die e-Strahl-Funktionalisierung die Quantenausbeuten der PS-Fluoreszenz beeinflusst, kann auf Basis der Unsicherheiten der DRUV- und der Fluoreszenzmessungen nicht gefolgert werden.

4.2.4 Zeitaufgelöste Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz der PS-dotierten Membranen

Die bisherigen photophysikalischen Untersuchungen zeigen, dass im Rahmen der Messgenauigkeiten die PS nach der e-Strahl-Funktionalisierung intakt bleiben und ihre Eigenschaft zur Fluoreszenzemission beibehalten. Im Folgenden werden diese Betrachtungen auf das Potenzial zur $^1\text{O}_2$ -Generierung der Membranoberflächen ausgeweitet.

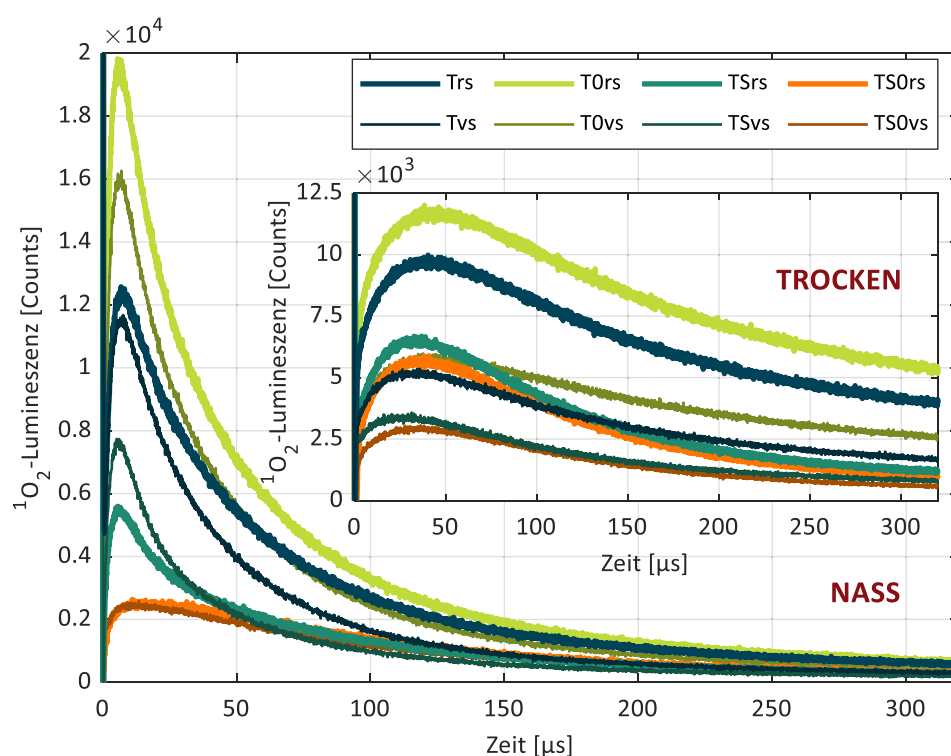


Abb. 4.2-6 Zeitaufgelöste $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz trocken oder nass an Vorder- (vs) und Rückseite (rs) vermessener Membranen. Es wurden 6×6 -Pixel-Raster à 1mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale sind über alle 36 Messpixel eines Scans aufsummiert. Bezeichnungen: TMPyP- (T/T0) und TPPS-dotierte (TS/TS0) e-Strahl-funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte Membranen.

Alle PS-dotierten Membranen (T/T0 sowie TS/TS0) sind dazu in der Lage $^1\text{O}_2$ zu generieren. Dabei liefern Kontrollmessungen außerhalb des $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzspektrums bei 1200 nm keine Hinweise auf Sauerstoffverarmung, d.h. die Signale sind gegenüber der Messung um 1270 nm vernachlässigbar. Die untergrundkorrigierten $^1\text{O}_2$ -Signale der trocken gescannten Proben in Abb. 4.2-6 zeigen ein sehr langsames Abklingverhalten mit einer dominanten mittleren Lebensdauer von deutlich über 100 μs , wofür vermutlich die hohe Porosität der Membranen verantwortlich ist. Das könnte auch die innerhalb des maximal auflösenden Messfensters von 320 μs größer erscheinenden Signale der Membranrückseiten mit den größeren Poren erklären. Im Trockenzustand beträgt die relative Signalintensität $\{T0 > T\}$ und $\{TS \geq TS0\}$. Stellt man das den beobachteten Fluoreszenzintensitäten in Abb. 4.2-4 gegenüber, ist besonders letzteres überraschend und kann auf eine weniger effiziente $^1\text{O}_2$ -Generierung hindeuten. Verantwortlich könnte aber auch die Lokalisierung der in der TS0-Membran verbliebenen TPPS-Moleküle sein, die vermutlich tief im Membranpolymer eingebettet sind. Dort kann von einer insgesamt höheren strahlenden Ratenkonstante für $^1\text{O}_2$ ausgegangen werden [293].

Um den Einfluss einer veränderten Mikroumgebung auf die Lumineszenzkinetik zu untersuchen, wurden zusätzliche Vergleichsmessungen an wassergetränkten Membranen unter sonst gleichen Messbedingungen durchgeführt. Die nass gescannten Proben zeigen mit Ausnahme der TS0-Membranen deutlich veränderte Signale mit einer insgesamt schnelleren Kinetik. Das könnte bestätigen, dass alle für das Wasser leicht zugänglichen PS-Moleküle durch die Nachbehandlung herausgewaschen wurden und die Kinetik somit von sich tief im Membranpolymer befindlichen TPPS-Molekülen dominiert wird. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass der Elektronenbeschuss bei den TS-Membranen zu einer Fixierung der PS-Moleküle an der Substratoberfläche führt. Auch hier erscheint dieser Effekt auf der Vorderseite stärker ausgeprägt – und zwar sowohl für die T- als auch die TS-Membran mit einer insgesamt kürzeren Signalkinetik im Vergleich zur jeweiligen Rückseite. Unabhängig von PS, Membranseite oder Inkubationsbedingungen (nass/trocken) zeigen alle zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignale mindestens einen langen Ausläufer von über 70 μs . Es ist nicht ausgeschlossen, dass dafür diffusionsbegrenzter Sauerstofftransport im Polymer verantwortlich ist [294, 295] und die Signalkinetik nicht mehr ausschließlich einem Abklingverhalten erster Ordnung gehorcht

[296, 297]. Zwar ist die Sauerstofflöslichkeit in PES vergleichbar mit wässriger Umgebung [298], jedoch ist die entsprechende Diffusionskonstante mindestens um zwei Größenordnungen geringer [191, 298–300], was in einer deutlichen Zunahme der PS-Triplett-Lebensdauer resultiert. Tatsächlich kann das nicht ausgeschlossen werden, da alle Kontrollmessungen bei 1200 mindestens einen langen Ausläufer von über 50 μ s vermuten lassen, dieser aber aufgrund des sehr geringen SRV nicht näher abzuschätzen ist.

Zusammenfassend zeigen die Messungen der zeitaufgelösten NIR-Lumineszenz, dass ein $^1\text{O}_2$ -Nachweis an den Membranen möglich ist und die Signale wichtige Anhaltspunkte für die PS-Lokalisierung geben können. Diese ist von größter Wichtigkeit für die PDI-Aktivität. Auch hier bestätigt sich der deutlich stärkere Einfluss der e-Strahl-Funktionalisierung auf die TPPS- im Vergleich zur TMPyP-Dotierung.

4.2.5 Extraktionsversuche und Stabilität der Immobilisierung

Ausgehend von den vorangegangenen Untersuchungen ist lediglich für die TPPS-funktionalisierten Membranen ein klar positiver Einfluss auf die Menge des immobilisierten PS durch die e-Bestrahlung auszumachen. Weitere Einblicke in die PS-Immobilisierung sollten zusätzlich Extraktionsversuche in wässriger Umgebung und mit EtOH liefern. Beide PS sind sowohl wasser- als auch alkohollöslich. Für die Extraktionsversuche wurden T-, T0- und TS-Membranen in unterschiedlichen Medien eingelagert: PBS, das in PDI-Versuchen als Zellmedium dient, EtOH und Nasslagerung auf unbehandeltem Laborfilterpapier (FP). Aufgrund der geringen Ausgangsfärbung und dem klaren Einfluss der e-Strahl-Funktionalisierung wurden die TS0-Membranen hierbei nicht untersucht. Der Extraktionsversuch auf FP wurde aus den folgenden Gründen gewählt: Die Cellulose des FP ist stark hydrophil und in Summe negativ geladen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es bei nass aufeinander gelagertem FP und Mikrofiltrationsmembran wegen des Konzentrationsgradienten zu einer Aufnahme in der Membran schwach gebundener bzw. adsorbierter PS-Moleküle durch das FP kommt, und zwar im relativen Maße $\text{TMPyP} > \text{TPPS}$ aufgrund der negativen Oberflächenladung des FP. Dies konnte in Vorversuchen mit eigens gefärbten Mikrofiltrationsmembranen, synthetischen und natürlichen Textilien bestätigt werden.

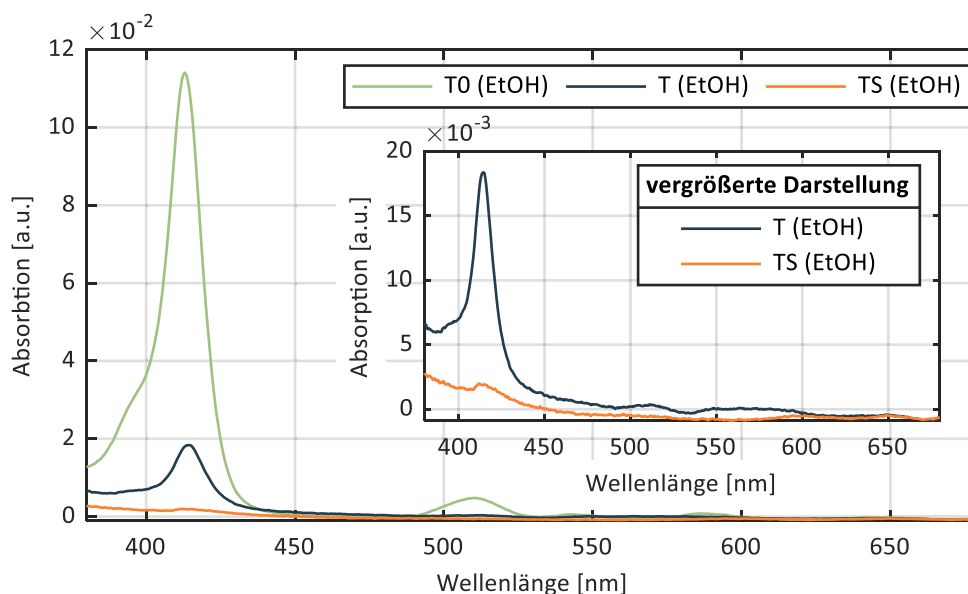


Abb. 4.2-7 Im EtOH-Extrakt gemessene Absorptionsspektren nach 24-stündiger Inkubation der e-Strahl-funktionalisierten TPPS-dotierten (TS) sowie e-Strahl-funktionalisierten und nicht-funktionalisierten TMPyP-dotierten (T/T0) Membranen in EtOH (jeweils sechs 10mm-Membranen in 6 ml EtOH).

In Abb. 4.2-7 sind die Absorptionsspektren des Extraktes nach 36-stündiger Lagerung in EtOH der T-, T0- und TS-Membranen dargestellt. Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied der durch das EtOH herausgelösten PS-Menge von $T0 \gg T > TS$. In diesem Versuch lässt sich erstmalig der deutliche Mehrwert der e-Strahl-Funktionalisierung bei der TMPyP-Fixierung nachweisen. Die T-Membranen sind EtOH-beständiger als die unbestrahlten T0-Membranen. Ein Auswaschen von TPPS-Molekülen ist kaum noch nachweisbar und die TS-Membranen können als EtOH-beständig eingestuft werden. Ausgehend von den Absorptionsspektren wurde eine grobe Quantifizierung des jeweils ausgewaschenen PS durchgeführt. Diese ergab ≤ 150 nmol/g (T0), ≤ 20 nmol/g (T) und ≤ 5 nmol/g (TS). Bezogen auf die in Kap. 4.2.2 abgeschätzte immobilisierte PS-Menge folgt daraus, dass ein Großteil der TMPyP-Moleküle aus den T0-Membranen gelöst wurde. Für die T- und TS-Membranen beträgt dieser Anteil nur ein Fünftel bzw. ein Zehntel. Tatsächlich waren an den T0-Membranen nach diesem Versuch Fluoreszenzsignale nur noch knapp oberhalb der Nachweisgrenze messbar. Im Gegensatz zum Extraktionsversuch in EtOH ließ sich in PBS kein PS-Bluten nachweisen – alle Membranen sind daher sowohl H₂O als auch PBS-beständig einzustufen. Auf nassem FP lässt sich nach 48-

stündiger Lagerung ein deutliches Bluten der TMPyP-dotierten Membranen nachweisen (Abb. 4.2-8), dabei bluten die T0-Membran stärker. Auf der TS-Membran ist demgegenüber kein Bluten nachweisbar.

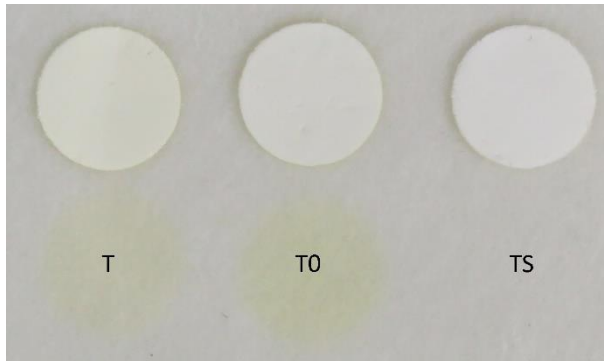


Abb. 4.2-8 Foto der PS-Abdrücke der e-Strahl-funktionalisierten TPPS-dotierten (TS) sowie e-Strahl-funktionalisierten und nicht-funktionalisierten TMPyP-dotierten (T/T0) Membranen nach 48-stündiger Lagerung auf nassem Filterpapier. Die zugehörigen Proben sind direkt über den Abdrücken platziert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach der e-Strahl-Funktionalisierung für die TMPyP-Immobilisierung von keinem überwiegend kovalenten Mechanismus ausgegangen werden kann. Im Fall von TPPS ist dieser nicht ausgeschlossen, da einzig bei den TS-Membranen kein Bluten festgestellt werden konnte. Dies bestätigt die photophysikalischen Voruntersuchungen, in denen ein größerer Einfluss der e-Strahl-Funktionalisierung auf die TPPS-dotierten Membranen nachgewiesen werden konnte. Ein Mehrwert für die TMPyP-Immobilisierung durch die Bestrahlung bei 200 kGy lässt sich nur für die EtOH-Beständigkeit festhalten.

4.3 PDI-Aktivität der funktionalisierten Membranen

Im Folgenden wird die PDI-Aktivität der T- und TS-Membranen verglichen. Die T0- und TS0-Membranen werden dabei nicht mehr berücksichtigt. Zunächst erfolgt eine qualitative Bewertung der PDI des *M. luteus* und des *E. coli* unter Dauerbeleuchtung. Anschließend wird die Zellinaktivierung und potentielle antimikrobielle Wirkung der Membranen gegen den *E. coli* auf Basis von Zählversuchen der KBE quantitativ ermittelt. Sowohl die Inokulation als auch die Beleuchtung erfolgten auf der Vorderseite der Membranen.

4.3.1 Semiquantitative PDI von Bakterien

Sowohl die T- als auch die TS-Membranen wirken phototoxisch auf gramnegative und grampositive Bakterien (Abb. 4.3-1). Nach zweitägiger Dauerbeleuchtung ist auf den Dunkelkontrollen und den beleuchteten Referenzmembranen ein deutliches Wachstum der Bakterien sichtbar. Die beleuchteten T- und TS-Membranen weisen demgegenüber keinerlei bakterielles Wachstum auf. Bei einer anschließenden Dunkelinkubation der Proben blieben diese frei von bakteriellem Wachstum – d. h. im Verlauf der zweitägigen Beleuchtung wurden alle Bakterien abgetötet.

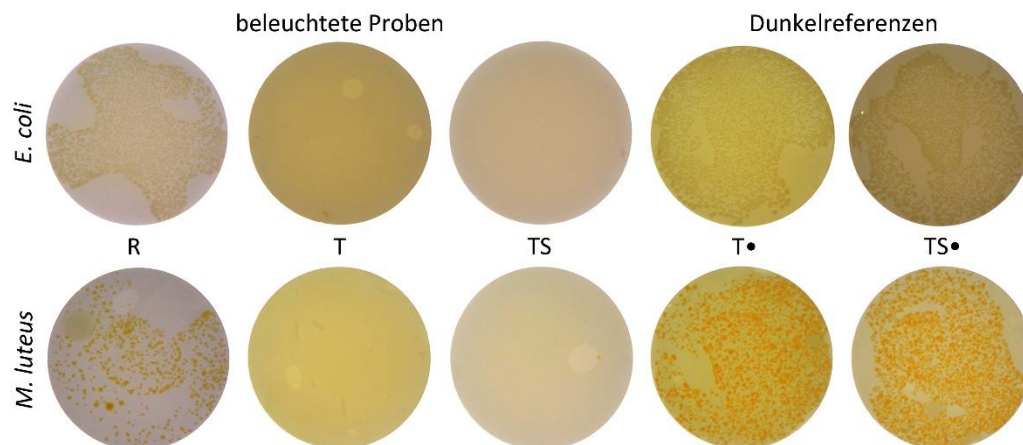


Abb. 4.3-1 PDI des gramnegativen *E. coli* bzw. des grampositiven *M. luteus* durch e-Strahlungsfunktionalisierte TMPyP- (T) und TPPS-dotierte (TS) Membranen im Vergleich zu Referenzmembranen (R) nach zweitägiger Dauerbeleuchtung mit Weißlicht. Die mit *E. coli* inokulierten Proben wurden mit $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ und die mit *M. luteus* inokulierten Proben mit $1,0 \pm 0,5 \text{ mW/cm}^2$ beleuchtet. Die Dunkelkontrollen sind mit einem • markiert. Der Versuch wurde an den großen (47 mm Durchmesser) Membranen durchgeführt. Für eine bessere Sichtbarkeit der Bakterien wurde eine nachträgliche Korrektur der Gradationskurve durchgeführt. Die auf den beleuchteten T- und TS-Membranen gut sichtbaren hellen Flecken sind auf Luft einschüsse unter den Membranen zurückzuführen.

4.3.2 Quantitative Zellviabilität nach PDI von *E. coli*

Die Quantifizierung der PDI gegen das gramnegative Modellbakterium *E. coli* erfolgte unter leicht angepassten Beleuchtungsbedingungen, um einen besseren Vergleich der zwei unterschiedlichen PS gewährleisten zu können [258]. Dafür wurde die PS-spezifische Extinktion mit dem Emissionsspektrum der Weißlichtquelle gewichtet und im Resultat die Intensität der Beleuchtung der TS-Membranen im Vergleich zu den T-Membranen verdoppelt. Die Ergebnisse der relativen Zellviabilität nach zweistündiger Beleuchtung sind in Abb. 4.3-2 (links) logarithmisch dargestellt. Die T-Membranen zeigen eine sehr hohe ($\geq \log 5$ – d.h. mindestens 99,9999 % abgetöteter Keime) und die TS-Membranen nur eine geringe ($< \log 1$) phototoxische Wirkung. Keine der Membranen ist dunkeltoxisch. Das Experiment wurde viermal wiederholt und das nach den qualitativen PDI-Versuchen unerwartete Ergebnis der sehr geringen Phototoxizität der TS-Membranen validiert.

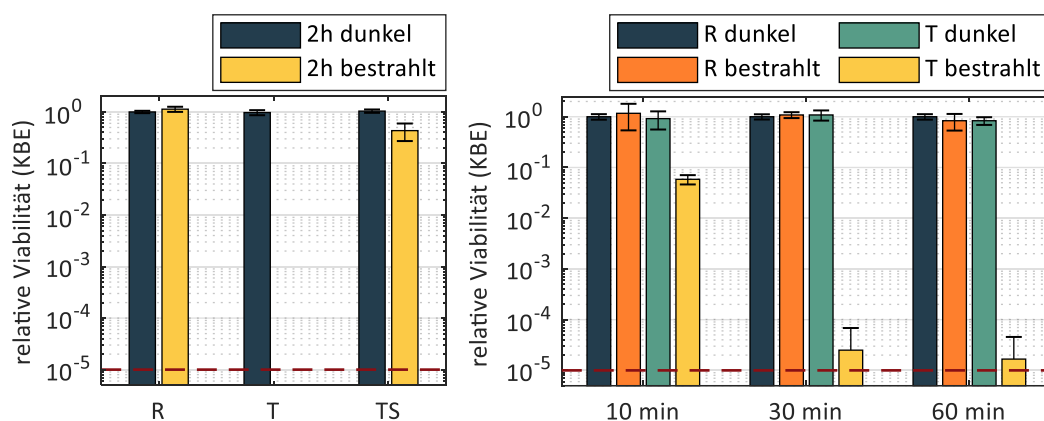


Abb. 4.3-2 Links: PDI von *E. coli* auf den R-, T- und TS-Membranen. Die Bestrahlung wurde mit der PS-Extinktion/LED-Emission gewichtet (cf. Abb. 3.2-4) und erfolgte für jeweils zwei Stunden bei $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ (T) bzw. $8 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ (TS und R). **Rechts:** PDI von *E. coli* auf den R- und T-Membranen nach 10, 30 und 60 Minuten. Die Weißlichtbestrahlung erfolgte bei $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$. Bezeichnungen: Referenzmembranen (R), TMPyP- (T) und TPPS-funktionalisierte (TS) Membranen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 18 Zählungen. Das jeweilige Zähllimit ist gestrichelt markiert. Die Zählwerte sind auf die jeweilige dunkel inkubierte Referenzmembran normiert.

Um die gute phototoxische Wirkung der T-Membranen – mit Viabilitätswerten unterhalb des Zähllimits – näher zu untersuchen, wurden zusätzliche KBE-Zählungen nach 10, 30 und 60 Minuten durchgeführt (Abb. 4.3-2 rechts). Dabei beträgt die Zellinaktivierung der T-Membranen nach zehnminütiger Beleuchtung mehr als eine \log_{10} -Stufe und bereits nach 30 Minuten mehr als vier

Log₁₀-Stufen. Im Rahmen dieser Bedingungen sind die T-Membranen somit nach 30-minütiger Beleuchtung mit Weißlicht von nur $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ als antimikrobiell einzustufen [52, 259]. Die TS-Membranen bleiben insgesamt hinter den Erwartungen zurück und sind zumindest unter diesen Bedingungen als lediglich leicht phototoxisch einzustufen.

Da die verwendete Beleuchtungsintensität mit der Emission der Lichtquelle und PS-Absorption gewichtet wurde, kann der extreme Unterschied der phototoxischen Wirkung der T- und TS-Membranen auf drei Gründe eingegrenzt werden: (1) Die Menge des immobilisierten PS, (2) die relative ¹O₂-Generierung und (3) die Wechselwirkung des PS mit den Bakterienzellen, z. B. eine nicht auszuschließende Extraktion des TMPyP durch die Bakterien. Tatsächlich liegen auch außerhalb der Messunsicherheiten die T-Membranen bei den ersten beiden Punkten im Vorteil. Der dritte Punkt wird im Rahmen Fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen im nächsten Abschnitt untersucht.

4.4 Extraktion des Photosensibilisators durch Bakterien

In Bakteriensuspension mit frei gelöstem PS lässt sich die im Grundlagenkapitel 2.3.2 beschriebene gänzlich unterschiedliche Affinität eines anionischen im Vergleich zu einem kationischen Porphyrin zu den Zellwänden des gramnegativen *E. coli* z. B. anhand von Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nachweisen [301]. In Abb. 4.4-1 wird dieser Unterschied eindrücklich in CLSM-Aufnahmen am Beispiel der beiden hier untersuchten PS TMPyP und TPPS dargestellt. Im überlagerten Fluoreszenz- und Streulichtbild ist deutlich eine Kolokalisierung der TMPyP-Fluoreszenz mit den Bakterienzellen zu sehen. Für TPPS ist das nicht der Fall. Die Aufnahmen erfolgten nur wenige Minuten (< 5 min) nach Zugabe des PS in die Bakteriensuspension.

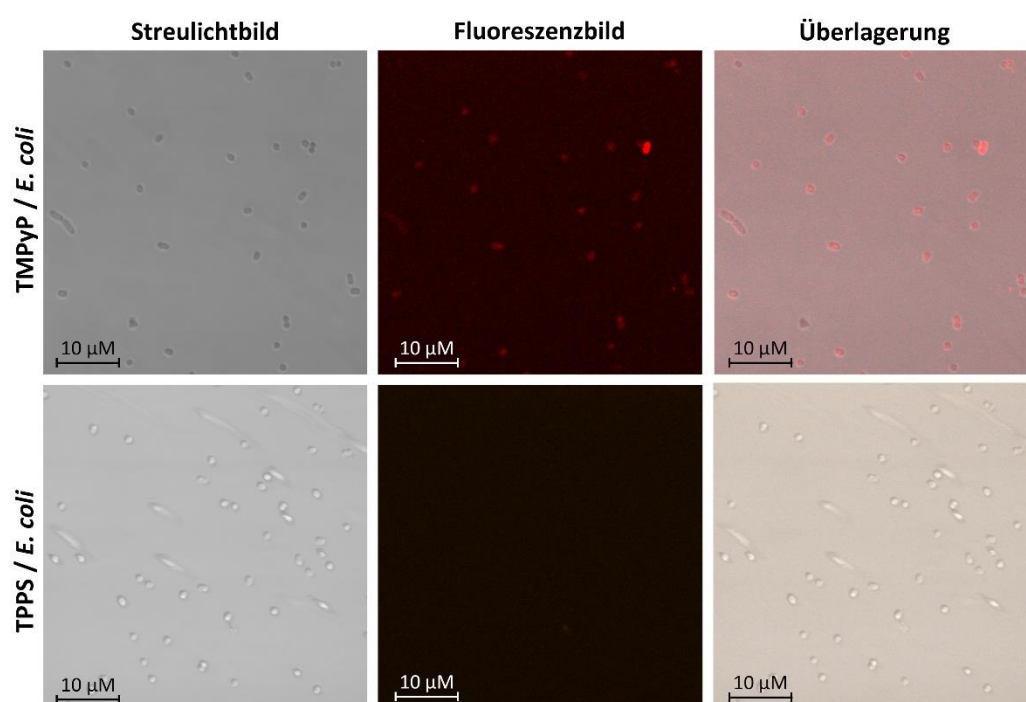


Abb. 4.4-1 Fluoreszenz- und Streulichtaufnahmen mit TMPyP und TPPS (50 µM) inkubierter Bakteriensuspensionen (10^8 KBE/ml *E. coli* in PBS) – Anregung bei 405 nm, Emission zwischen 650 und 750 nm. Die Einfärbung des Fluoreszenzsignals wurde willkürlich gewählt.

Um eine mögliche TMPyP-Extraktion durch Bakterien zu untersuchen, wurde dieses Experiment unter gleichen Mikroskopierbedingungen an mit *E. coli* inkultierten T-Membranen wiederholt (Abb. 4.4-2). Darin zeigt die T-Membran eindeutig ein fortschreitendes Bluten des ursprünglich in der Membran immo-

bilisierten TMPyP: Unmittelbar nach Inokulation der Membranen mit den Bakterien ist nur eine uniforme Fläche zu sehen. Grund dafür ist der fehlende Kontrast zwischen Zellen und Membran, sodass im Streulichtbild keine Bakterien erkennbar sind. Das ändert sich nach wenigen Minuten, in deren Verlauf Bakterien mit TMPyP angereichert werden und sich der Kontrast erhöht. Dabei nimmt sowohl die Zahl der erkennbaren Bakterien als auch deren Kontrast zu. In der Überlagerung von Streulicht- und Fluoreszenzbild im Bereich der typischen TMPyP-Emission ist nach 18-minütiger Inkubation eindeutig eine Kolo-kalisierung von PS und Bakterien zu sehen. Unter den gleichen Bedingungen verharren die TS-Membranen im ersten beschriebenen Zustand – auch nach zweistündiger Beobachtungsdauer. Somit wird deutlich, dass trotz der Funk-tionalisierung TMPyP von den *E. coli* aus den Membranen gezogen wird.

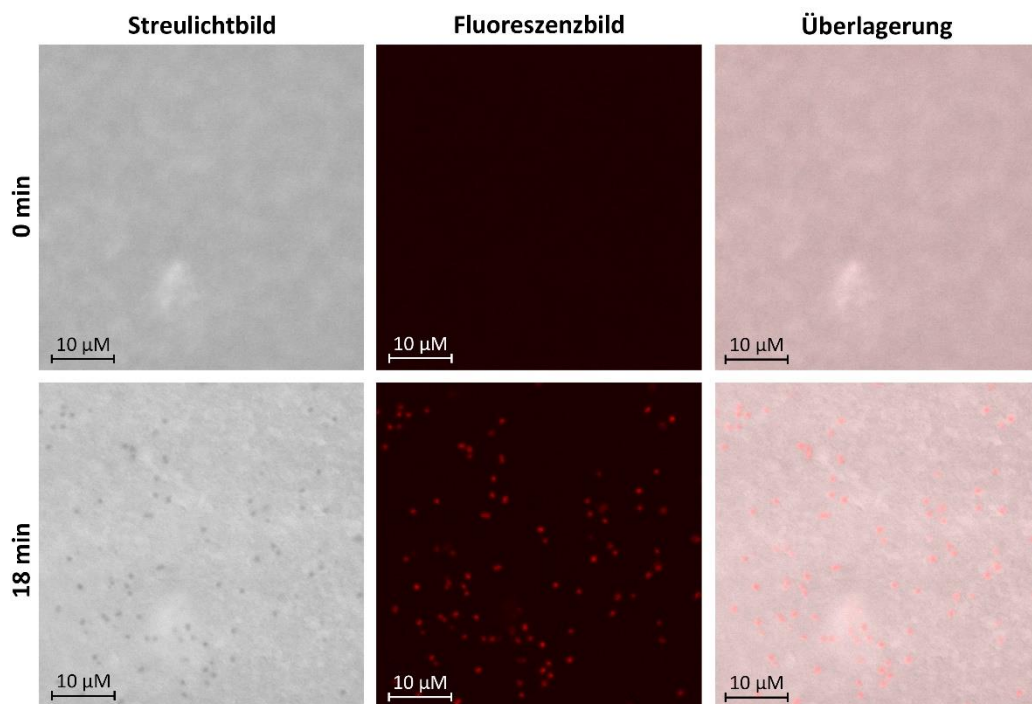


Abb. 4.4-2 Fluoreszenz- und Streulichtaufnahmen der Vorderseite der TMPyP-funktionalisierten Membranen getränkt mit Bakteriensuspension (10 µl mit 10^8 KBE/ml *E. coli* in PBS) – Anregung bei 405 nm, Emission bei 650 bis 750 nm. Die Aufnahmen erfolgten unmittelbar nach Inokulation (obere Bildreihe) und 18 Minuten später (untere Bildreihe).

Kombiniert man diese Zusammenhänge mit der sehr effizienten PDI zellgebundener TMPyP-Moleküle, wird der festgestellte Unterschied der PDI zwischen T- und TS-Membranen im vorangegangenen Abschnitt klar. Dies konnte

nachträglich in unmittelbar nach einem der für Abb. 4.3-2 durchgeführten Experimente bestätigt werden. Dafür wurde die Absorption im PBS-Bakterien-Extrakt der nullten Verdünnungsstufe eines quantitativen PDI-Experiments nach M&M mit *E. coli* gemessen. Mit diesen Messungen lässt sich im Extrakt eindeutig TMPyP, aber kein TPPS nachweisen. Im Vergleich dazu ist bei analog untersuchten T0-Membranen die Menge des herausgelösten TMPyP in etwa um den Faktor drei bis zehn erhöht. Diese Ergebnisse sind unabhängig davon, ob die Proben bestrahlt oder dunkel inkubiert wurden. Schätzt man die Menge des aus den T-Membranen herausgelösten TMPyP mit dem eingesetzten Inokulationsvolumen ab, ergibt sich eine TMPyP Konzentration von maximal einem μM – eine hinreichende Menge um innerhalb von zwei Stunden alle *E. coli* abzutöten.

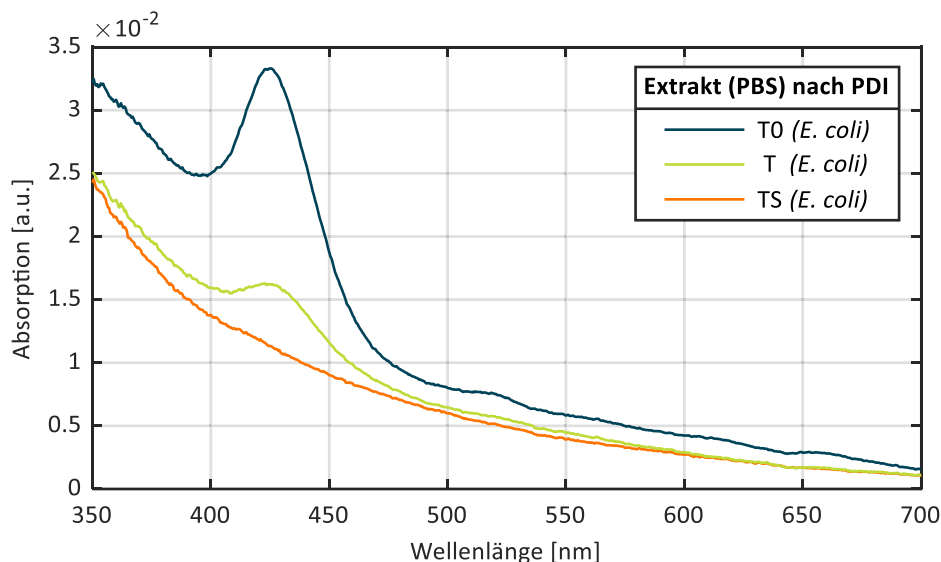


Abb. 4.4-3 Absorptionsmessung im Extrakt mit 1 ml mit PBS gespülter Membranen nach einem PDI-Experiment mit *E. coli*. Bezeichnungen: e-Strahl-funktionalisierte TPPS-dotierte (TS) und funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte TMPyP-dotierte (T/T0) Membranen.

Somit kann auf Basis dieser Experimente formuliert werden, dass die PDI-Aktivität der T-Membranen größtenteils auf nicht zureichend immobilisierten PS-Molekülen beruht. Nichtsdestotrotz wird durch die e-Strahl-Funktionalisierung auch eine höhere Beständigkeit gegenüber einer Bakteriensuspension erreicht, wie der Extrakt der T- und T0-Membranen verdeutlicht.

4.5 Photodegradation und Photostabilität der funktionalisierten Membranen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die e-Strahl-Funktionalisierung zu PDI-aktiven Membranen führt, soll in diesem Abschnitt eine mögliche lichtinduzierte Substratdegradation durch den generierten $^1\text{O}_2$ sowie die Lichtbeständigkeit des immobilisierten PS untersucht werden. Für beide Untersuchungen wurden die Membranen bis zu 21 Tage lang in einem Wasserbad mit Weißlicht, wie es für typische Bakterienversuche mit *E. coli* verwendet wurde ($4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$), bestrahlt. Das Wasserbad wurde verwendet, um möglichst anwendungsnahe Bedingungen zu schaffen.

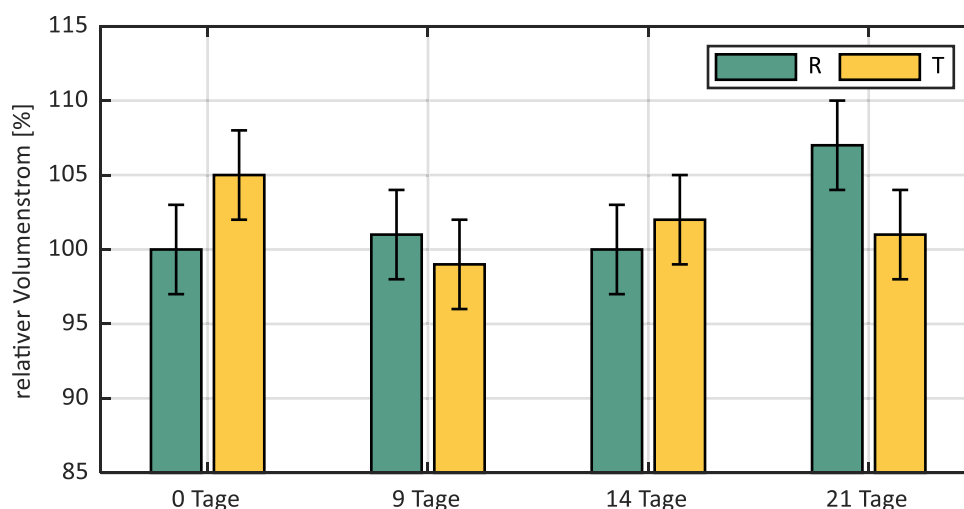


Abb. 4.5-1 Abschätzung einer möglichen Photodegradation des Membranmaterials mittels Volumenstrommessungen nach bis zu 21-tägiger Dauerbeleuchtung der TMPyP-funktionalisierten (T) Membranen im Vergleich zu den Referenzmembranen (R) mit $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$. Die Fehlerbalken wurden durch Fehlerfortpflanzung aus den Unsicherheiten der Volumen-, Zeit- und Druckmessung sowie Standardabweichung ($n=12$) ermittelt.

Zur Bewertung einer möglichen Polymerdegradation wurden Durchflussratenmessungen mit destilliertem Wasser durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob eine Erhöhung der Durchflussrate, wie sie durch eine Polymerdegradation des Membranmaterials hervorgerufen wird [302, 303], beobachtet werden kann. Für die Messung wurden die Membranen in ein Vakuumfiltrationsgerät eingesetzt und der Volumenstrom bei einem Unterdruck von 200 mBar ermittelt. Es wurden nur die T-Membranen mit der nachweislich

besseren $^{10}\text{O}_2$ -generierung untersucht und mit unmodifizierten Referenzmembranen verglichen. Dabei konnte innerhalb der Messunsicherheit von 3 % keine Veränderung beobachtet werden (Abb. 4.5-1). Innerhalb dieser Bedingungen kann somit keine Polymerdegradation, die zu einer Zunahme des relativen Volumenstroms führen würde, festgestellt werden.

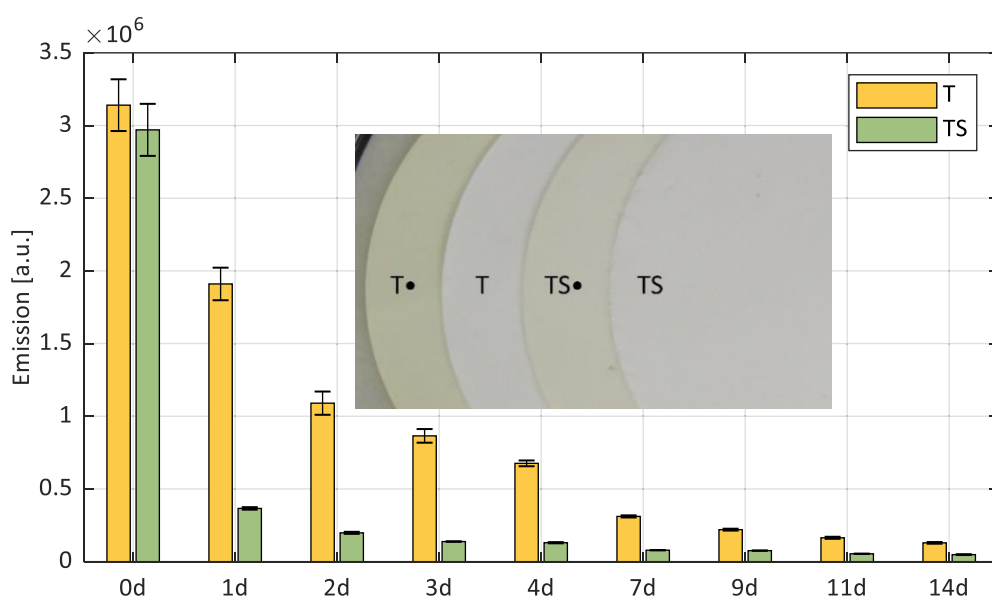


Abb. 4.5-2 Photostabilität der TMPyP- (T) und TPPS-funktionalisierten (TS) Membranen – im Balkendiagramm ist die über ein 6x6-Pixel-Raster gemittelte Abnahme der Fluoreszenzemission der Proben nach bis zu 14-tägiger Weißlichtbeleuchtung mit $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ dargestellt. Die Fehlerbalken wurden aus der Standardabweichung ($n=36$) und Justagegenauigkeit abgeschätzt. In der Mitte ist ein Foto der Membranen und ihrer Dunkelkontrollen (•) nach 14 Tagen abgebildet.

Die Photostabilität der T- und TS-Membranen, bzw. das Ausbleichen des jeweiligen PS, wurde auf Basis von Fluoreszenzscans verglichen. Hierfür wurden Raster von 6×6 Pixeln aufgenommen und die Fluoreszenzemission im PS-Bereich aufsummiert – die Ergebnisse können Abb. 4.5-2 entnommen werden. Sowohl die Bestrahlung als auch die Messung erfolgten auf der Membranoberseite. Die Emission der beiden Membranen nimmt bereits nach einem Tag um ca. 30 % für die T- und mehr als 80 % für die TS-Membranen ab. Nach sieben-tägiger Dauerbeleuchtung sind beide Membranen um mindestens 90 % ausgebleichen. Insgesamt bleichen die TS-Membranen deutlich schneller aus und weisen bereits nach dreitägiger Beleuchtung nur noch Signale knapp

oberhalb der Nachweisgrenze auf. Für die T-Membran ist das erst nach 14 Tagen der Fall. Dies gilt ebenfalls für die $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz, die hier nicht dargestellt ist, da sie insgesamt annähernd dem Verlauf der PS-Fluoreszenz folgt [282]. In Abb. 4.5-2 ist zusätzlich ein Foto der beleuchteten Membranen im Vergleich zu den dunkel inkubierten Kontrollproben nach 14 Tagen dargestellt – augenscheinlich sind die Membranen vollständig ausgebleichen. Zum Vergleich wurden die beiden PS ebenfalls in freier Lösung untersucht (hier nicht dargestellt). Auch dort zeigte sich ein deutlich schnelleres Ausbleichen des TPPS mit einem innerhalb der Messgenauigkeit vergleichbaren Verhältnis wie bei den Membranen. Somit wird das beobachtete Ausbleichen der Membranen nicht auf die Funktionalisierung, sondern auf die intrinsische PS-Struktur zurückgeführt.

4.6 Zusammenfassende Bewertung

In diesem Abschnitt wurden e-Strahl-funktionalisierte Mikrofiltrationsmembranen photophysikalisch charakterisiert und auf ihre Eignung als PDI-aktive Oberflächen untersucht. Alle photophysikalischen Messungen in Kap. 4.2 und ihr Vergleich zwischen e-Strahl-funktionalisierten (T/TS) und nicht-funktionalisierten (T0/TS0) Membranen zeigen einen deutlich größeren Einfluss des e-Strahls auf die Immobilisierung des TPPS im Gegensatz zum TMPyP. Das betrifft sowohl die relative Menge des immobilisierten PS als auch spektrale Unterschiede der Fluoreszenz oder Unterschiede in der Kinetik der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die Bestrahlung nur einer Seite der Membran ebenfalls eine Rolle spielt. Das war im Fall der TS-Membranen besonders eindrücklich der Fall und bereits beim visuellen Vergleich der Einfärbung deutlich nachvollziehbar. Eine in diesem Zuge insgesamt effizientere Immobilisierung des TPPS durch die e-Strahl-Funktionalisierung zu folgern ist jedoch fraglich. Die deutlich höhere PS-Menge der T/T0-Membranen im Verhältnis zu den TS/TS0-Membranen macht vielmehr folgende Annahme plausibel: Die Immobilisierung wird unabhängig vom Elektronenbeschuss von einer physikalischen Adsorption auf Basis elektrostatischer Wechselwirkungen dominiert. Das kationische TMPyP haftet deutlich besser an den in Summe negativ geladenen PES-Membranen. Die Radikalbildung durch Elektronenbeschuss auf der Membranoberfläche scheint der negativen Oberflächenladung der Membran aber zumindest in geringem Maße entgegenzuwirken und die Fixierung einer größeren TPPS-Menge zu ermöglichen. Für das TMPyP ist dieser Effekt vernachlässigbar. Ob tatsächlich und in welchem Maße auch eine kovalente Fixierung von PS-Molekülen vorliegt, kann auf Basis dieser Ergebnisse nicht eingeschätzt werden. Zumindest für die TMPyP-dotierten Proben scheint eine dominierende kovalente Anbindung unwahrscheinlich. Letztlich ist das ausschließliche Auswaschen der Membranen mit H_2O nach der Funktionalisierung nicht geeignet das zu beurteilen. Erst die Extraktionsversuche mit EtOH in Kap. 4.2.5 konnten zeigen, dass durch die Bestrahlung eine höhere Beständigkeit der T-Membranen erreicht wird. Damit konnte ein positiver Einfluss auf die Immobilisierung des TMPyP durch die e-Strahlen nachgewiesen werden. Weitere Hinweise für eine bessere PS-Immobilisierung durch die Bestrahlung liefern sowohl Extraktionsversuche auf nassem Filterpapier als auch mit Bakteriensuspension.

Unabhängig von der e-Strahl-Funktionalisierung bleibt die photophysikalische Aktivität, bezogen auf die Floreszenz und insbesondere $^1\text{O}_2$ -Generierung, für die T- und TS-Membranen erhalten. Es ergeben sich weder Hinweise auf eine PS-Zerstörung noch PS-Aggregation nach der Funktionalisierung. Die Messung der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik trocken und nass gescannter Membranen liefert wichtige Hinweise für die Lokalisation des PS im Substrat. Sowohl die TPPS- als auch die TMPyP-funktionalisierten Membranen zeigen eine deutliche Änderung der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik bei veränderter Mikroumgebung. Im Nasszustand sind sowohl An- als auch Abklingen der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz kürzer, die Gegenwart eines zusätzlichen dynamischen Quenchings durch das Wasser ist deutlich nachvollziehbar. Daraus lässt sich ableiten, dass hinreichend PS an der Substratoberfläche immobilisiert und durch Wassermoleküle gut erreichbar ist. Das ist essentiell, da nur so eine mögliche PDI-Aktivität erwartet werden kann. Im Resultat sind sowohl die T- als auch TS-Membranen im Rahmen eines qualitativen Versuchs phototoxisch gegen den grampositiven *M. luteus* und den gramnegativen *E. coli*. Da das TPPS in freier Lösung keine PDI-Wirksamkeit aufweist, wird die Annahme bestätigt, dass in immobilisierten Systemen eine rein durch Aufliegen hervorgerufene Nähe von Zellwand und PS eine hinreichende Bedingung für eine phototoxische Wirkung sein kann. Dessen ungeachtet demonstriert die Quantifizierung der PDI anhand von M&M-Versuchen eine vielfach effizientere Phototoxizität der T-Membranen gegen den *E. coli*. Ausgehend von CLSM-Aufnahmen von mit Bakteriensuspension inkubierten Membranen ist jedoch anzunehmen, dass dieser extreme Unterschied von mindestens vier Log_{10} -Stufen auf eine unzureichende Immobilisierung des TMPyP zurückzuführen ist (Kap. 4.4). Somit ist eine abschließende Bewertung der PDI-Aktivität beider Membranen nicht möglich.

Untersuchungen zur Photostabilität zeigen ein deutlich schnelleres Ausbleichen der TS-Membranen im Vergleich zu den T-Membranen. Das unterschiedliche Ausbleichverhalten bewegt sich dabei im Verhältnisrahmen der Photostabilität der beiden freien PS in Lösung, kann also nicht auf die e-Strahl-Funktionalisierung zurückgeführt werden. Der Einfluss des PS-Ausbleichens auf nachfolgende PDI-Versuche wurde nicht untersucht, jedoch ist auf Basis der Ergebnisse davon auszugehen, dass die TS-Membranen bereits nach wenigen PDI-Zyklen nicht mehr phototoxisch sind. Es konnten keine Hinweise auf eine photooxidative Degradation der Membranen gefunden werden.

Kapitel 5:

Funktionalisierte Textiloberflächen für die PDI

5.1 Funktionalisierung der Textiloberflächen

5.1.1 Kovalente Funktionalisierung

5.1.2 Textiltechnologische Funktionalisierung

5.2 Charakterisierung der kovalenten TriMPyP-Immobilisierung

5.2.1 Photophysikalische Eigenschaften des TriMPyP im Vergleich zum TMPyP

5.2.2 TriMPyP-Dotierung und Bindungsstabilität

5.2.3 Photosensibilisator-Fluoreszenz nach kovalenter Funktionalisierung

5.3 Charakterisierung der textiltechnologischen TMPyP-Immobilisierung

5.3.1 TMPyP-dotierung und Bindungsstabilität

5.3.2 Photosensibilisator-Fluoreszenz nach textiltechnologischer Funktionalisierung

5.4 Vergleich der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz beider Funktionalisierungsansätze

5.5 Phototoxizität der Textilproben

5.6 PS-Extraktion und -Photostabilität des der antimikrobiellen Probe I1nb

5.6.1 TMPyP-Extraktion mit *E. coli*

5.6.2 TMPyP-Photostabilität des Textilgewebes

5.7 Zusammenfassende Bewertung

5.1 Funktionalisierung der Textiloberflächen

Die Funktionalisierung erfolgte an kommerziellem Polyestergewebe für Raumtextilien. Für die Funktionalisierung der Textilgewebe wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt und hinsichtlich ihres PDI-Potenzials verglichen: Eine kovalente Fixierung des PS, sowie zwei klassische textiltechnologische Verfahren, bei denen eine Färbung durch Imprägnierung bzw. Einschmelzung des PS erreicht wird. In beiden Fällen wurde Polyester-(PET)-Gewebe und das vierfach kationische TMPyP, bzw. ein dreifach kationisches TMPyP-Derivat, verwendet. Die kovalente Funktionalisierung der Proben wurde durch M.Sc. Delara Hartmann an der Montanuniversität Leoben unter der Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Kern durchgeführt. Der textiltechnologische Modifizierungsansatz wurde unter der Leitung von Birgit Armbruster am TITV in Greiz (Textilforschungsinstitut Thüringen-Vogtland e. V.) umgesetzt. Die verwendeten Konzentrationen der PS wurden im Rahmen von Voruntersuchungen mit den Kooperationspartnern abgestimmt und angepasst. Der Fokus lag dabei auf einer möglichst geringen PS-Menge, um Raum für weitere Optimierungen zu lassen. Die Tab. 5.1-1 am Ende dieses Abschnitts fasst alle relevanten Färbeparameter der Textilproben zusammen.

5.1.1 Kovalente Funktionalisierung

Eine kovalente Anbindung von TMPyP an ein Textilsubstrat ist über die Modifizierung einer der vier Randgruppen des TMPyP mit einer funktionellen Carboxygruppe [116], oder auch einer Aminogruppe [120, 115, 114], und eine Aktivierung des Textilsubstrats möglich. Letzteres kann durch Aminierung [116, 121], Verseifung [118, 115] oder ionogene Modifikation [115, 107] des Substrates erreicht werden. Aufgrund der $^{10}\text{O}_2$ -quencheden Eigenschaften vieler Amine [128–130] wurden in dieser Arbeit die letzten beiden Wege verfolgt: Als Substrat dienten kommerzielle PET-Gewebe entweder als direkt erhältliches kationisch färbbares¹¹ PET (PET⁺) oder nachträglich alkalisch behandeltes neutrales PET (PET^a). Als asymmetrisch substituiertes TMPyP wurde das mit einer Carboxygruppe modifizierte TriMPyP verwendet (Abb. 3.1-1).

¹¹ In der Färbetechnik bedeutet *kationisch färbbar*, dass die Färbung mittels eines kationischen Farbstoffes erfolgt. Das Textilsubstrat hat daher einen anionischen Charakter. Im Fall von PET-Gewebe wird das i. d. R. durch Einbringen von Sulfonatgruppen während der PET-Polykondensation erreicht [304–306].

Für die PS-Kopplung wurde die Carbon-Säure des TriMPyP zunächst mittels Carbonyldiimidazol (CDI) in einer Feststoffreaktion (10 mg TriMPyP auf 2 mg CDI) aktiviert. Die anschließende PET-Färbung erfolgte wahlweise in 100 ml DMSO bei 130 °C oder 100 ml H₂O bei 100 °C für 60 Minuten. Die TriMPyP-Konzentration der Färbeflotte betrug 0,01 wt.%. Die alkalische Vorbehandlung der neutralen PET-Gewebe erfolgte in 1 M NaOH unter Reflux bei 100 °C. Im Resultat wird die kovalente Ankopplung des TriMPyP durch eine Ester-Bindung an das PET-Gewebe realisiert. Nach der Funktionalisierung wurden die Proben im Ultraschallbad in Wasser und EtOH gespült um überschüssiges TriMPyP zu entfernen.

5.1.2 Textiltechnologische Funktionalisierung

Für die Färbung wurden zwei textiltechnologische Standard-Verfahren verwendet: Imprägnierung und Färbung im Ausziehverfahren. Als Substrat diente das auch für die kovalente Funktionalisierung verwendete kommerzielle PET⁺-Gewebe, als PS nicht weiter modifiziertes TMPyP. Die Imprägnierung erfolgte im Foulard-Verfahren mit Binder und Vernetzer bei einer TMPyP-Konzentration von ca. 0,1 wt.% in der Färbeflotte. Bei dem Binder handelt es sich um ein kommerzielles Produkt unbekannter Zusammensetzung der Sera-Familie von DyStar (DyStar Colours Distribution GmbH). Dieser Binder liegt in nichtionogener synthetischer Polymerdispersion vor. Bei der Foulardierung wird der im Bindersystem adsorbierte PS – also eingebettet in einer Art Polymermatrix – mittels Walzen in das Textilsubstrat gequetscht. Im Gegensatz dazu wird der PS beim Ausziehverfahren thermisch durch Einschmelzen in den Fasern fixiert. Die dafür verwendete TMPyP-Konzentration betrug ca. 0,1 wt.%, wobei der Flotte noch Essigsäure, Netz- und Egalisierungsmittel zugesetzt wurden. Diese sorgen für eine gleichmäßigere Färbung und erhöhen die Färbeeffizienz. Um ein eventuell zu tiefes Einschmelzen des TMPyP in die Fasern zu identifizieren wurde neben der für Polyestergewebe üblichen Prozesstemperatur von 130 °C ein weiterer Probensatz bei 98 °C gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Proben einer nass-chemischen Nachbehandlung unterzogen, die schlecht gebundene TMPyP-Moleküle entfernen und damit die Waschechtheit erhöhen sollte. Die im Ausziehverfahren gefärbten Proben wurden mit Natronlauge, Hydrosulfit und Waschmittel nachbehandelt.

Die foulardierte Probe wurde mit anionischen Tensiden und nichtionogenem Waschmittel nachbehandelt. [307, 308]

Tab. 5.1-1 Probenbezeichnung und Zusammenfassung der relevanten Färbeparameter der in diesem Kapitel untersuchten PET-Gewebe (kationisch färbbares PET⁺ und alkalisch vorbehandeltes PET^a), die entweder kovalent oder mittels Imprägnierung (Imp.) bzw. im Ausziehverfahren (Ausz.) und einer Nachbehandlung (Nb.) funktionalisiert wurden.

Bez.	Textil	Verfahren	Färbeparameter		
			Flotte	PS [wt.%]	Temperatur
K1	PET ⁺	kovalent	DMSO/CDI	TriMPyP [0,01]	130 °C
K2	PET ^a	kovalent	DMSO/CDI	TriMPyP [0,01]	130 °C
K3	PET ⁺	kovalent	H ₂ O/CDI	TriMPyP [0,01]	100 °C
I1nb	PET ⁺	Imp.+Nb.	H ₂ O/Binder	TMPyP [0,1]	RT
A1nb	PET ⁺	Ausz.+Nb.	H ₂ O	TMPyP [0,1]	130 °C
A2nb	PET ⁺	Ausz.+Nb.	H ₂ O	TMPyP [0,1]	98 °C

Tabelle 5.1-1 fasst die im Folgenden untersuchten Proben und ihre wichtigsten Funktionalisierungsparameter zusammen. Die mit *K1* bis *K3* nummerierten Proben stehen für die kovalente Funktionalisierung. Die anderen drei im Gegensatz dazu textiltechnologisch funktionalisierten Proben werden in Abhängigkeit vom Verfahren mit *I1* für die Imprägnierung und *A1* bzw. *A2* für das Ausziehverfahren indiziert. Das Suffix *nb* deutet auf die zur Erhöhung der Waschechtheit durchgeführte Nachbehandlung hin. Vereinzelt werden diese Proben mit entsprechenden nicht nachbehandelten Textilgeweben verglichen. An diesen Stellen wird das *nb*-Suffix weggelassen.

Die Untersuchungen der Textilgewebe orientieren sich an der allgemein formulierten Methodik (Abb. 3.2-1) und folgen grob der Struktur zur Charakterisierung der Mikrofiltrationsmembranen. Dabei werden im ersten Untersuchungssegment zur Bewertung der PS-Dotierung und -Immobilisierungsstabilität die kovalent und die textiltechnologisch funktionalisierten Proben getrennt betrachtet (Kap. 5.2 und 5.3). Erst in Kap. 5.4 wird eine vergleichende Untersuchung der Proben zur ¹O₂-Generierung und seiner Kinetik durchgeführt und in Bezug zu den folgenden PDI-Versuchen in Kap. 5.5 gesetzt. Auf Basis der Ergebnisse wird schließlich die vielversprechendste Probe für weiterführende Experimente in Kap. 5.6 ausgewählt.

5.2 Charakterisierung der kovalenten TriMPyP-Immobilisierung

Im ersten Teil der Untersuchungen werden neben der Probenhaptik und -benetzbarkeit, der Farbeindruck sowie die Stabilität der PS-Immobilisierung der drei kovalent funktionalisierten Proben K1 bis K3 bewertet. Ein Vergleich der Probenhaptik und ihrer (Wasser)-Benetzbarkeit dient einer ersten Einordnung zu möglichen Unterschieden der Mikroumgebung des immobilisierten PS und wird eine Rolle bei der Interpretation der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik in Kap. 5.4 spielen. Zu Beginn wird jedoch das TriMPyP zunächst frei in Lösung hinsichtlich seiner photophysikalischen Eigenschaften charakterisiert und mit TMPyP verglichen. Damit sollte schon vor der Fixierung auf dem Textilsubstrat gewährleistet werden, dass der Photosensibilisator auch als PDI-geeignet verwendet werden kann. Das und eine tatsächlich stabile Anbindung des TriMPyP an das Textilsubstrat ist in diesem Abschnitt besonders kritisch zu betrachten, da die kovalente Kopplung schon im Labormaßstab komplizierter und aufwendiger als die textiltechnologische Funktionalisierung ist. Zudem ist das kommerziell erhältliche TriMPyP deutlich teurer als das TMPyP: Die aktuellen Kosten für das TriMPyP sind mindestens um einen Faktor 40 höher als für das TMPyP [309].

5.2.1 Photophysikalische Eigenschaften des TriMPyP im Vergleich zum TMPyP

Sowohl das Absorptions- als auch das Fluoreszenzverhalten des frei gelösten TriMPyP gleichen dem des TMPyP (Abb. 5.2-1 und Abb. 5.2-2). Auffällig ist die sehr undefinierte breite Fluoreszenz, wie sie schon vom TMPyP in wässriger Umgebung bekannt ist (Kap. 2.4.2). Somit ist auch für TriMPyP bei einer Anbindung/Einbettung in einem Substrat eine deutliche Ausbildung der beiden Fluoreszenzbanden zu erwarten. Die Fluoreszenzquantenausbeute von TMPyP in Wasser beträgt 5 % (Tab. 2.4-1). Relativ dazu ist die gemessene Fluoreszenzquantenausbeute des Derivates um 15 ± 5 % höher (Abb. 5.2-2 links). Zur relativen Bestimmung der $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute wurde für beide PS eine für TMPyP übliche um einen Phosphoreszenzterm erweiterte bi-exponentielle Modellfunktion verwendet [47, 161]. Die ermittelten Anpassungsfunktionen

wiesen ein χ^2_{red} von unter 1,01 auf. Die daraus errechnete $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute des TriMPyP ist relativ zu TMPyP um ca. 5 bis 10 % geringer (Abb. 5.2-2 rechts).

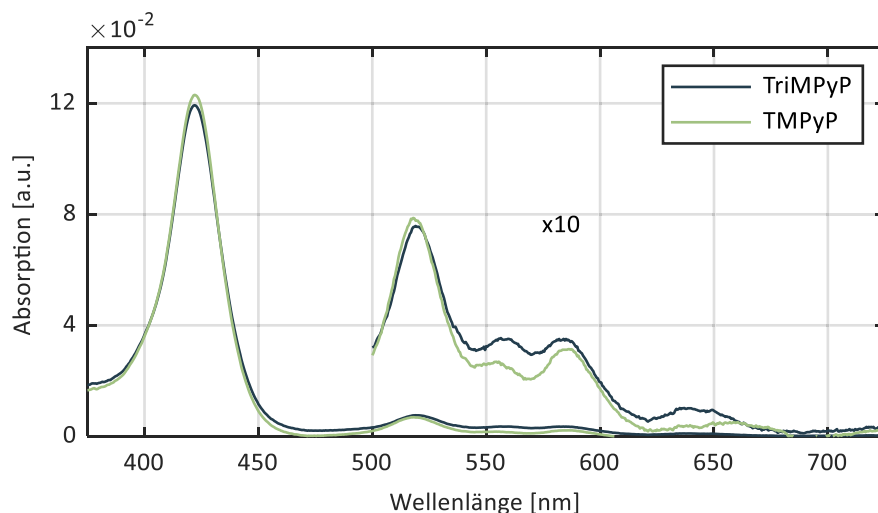


Abb. 5.2-1 Absorptionsspektren von TMPyP und seinem einfach substituierten Derivat TriMPyP in wässriger Lösung.

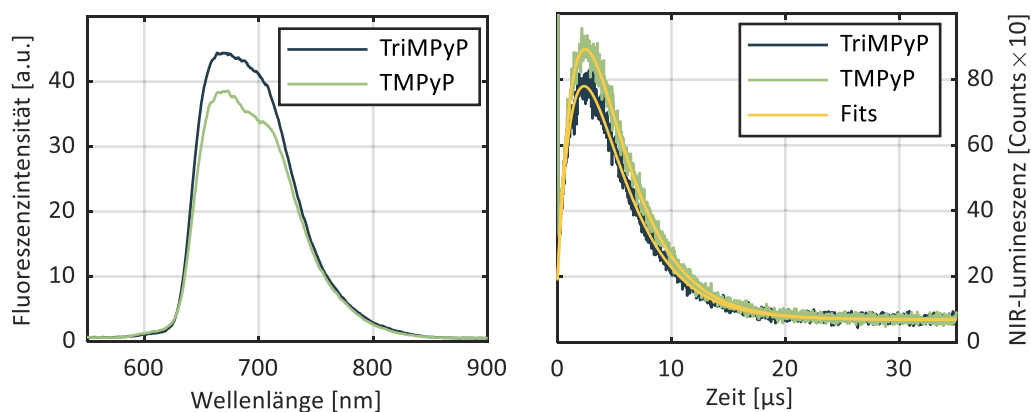


Abb. 5.2-2 Fluoreszenzspektren (links) und zeitaufgelöste $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz (rechts) von TMPyP und seinem einfach substituierten Derivat TriMPyP in wässriger Lösung zur relativen Bestimmung der entsprechenden Quantenausbeuten. Die Anregung der beiden Messungen erfolgte bei 405 nm bei einer festen optischen Dichte von 0,04.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist keine maßgebliche Einschränkung der photodynamischen Aktivität im Vergleich zum TMPyP zu erwarten [202]. Dies konnte mittels Hemmhofversuchen an gramnegativen *E. coli* und grampositiven *M. luteus* bestätigt werden (hier nicht dargestellt).

5.2.2 TriMPyP-Dotierung und Bindungsstabilität

Die Haptik der Textilgewebe bleibt nach der kovalenten Funktionalisierung unbeeinflusst. Die Probe K2 weist aber eine bessere Wasserbenetzbarkeit auf als die Proben K1 und K3, was auf die Alkalisierung des PET^a-Substrats zurückzuführen ist [310]. Die drei Proben zeigen im Vergleich zu den Ausgangssubstraten eine gleichmäßige PS-Einfärbung mit deutlichen Unterschieden im Eindruck der Farbtiefe (Abb. 5.2-3). Das Verhältnis des Farbeindrucks beträgt $K1 \gg K3 > K2$. Eine ergänzende Charakterisierung des immobilisierten TriMPyP auf Basis von Reflexionsmessungen war nicht möglich. Durch die intensive Färbung konnten keine vollständigen DRUV-Spektren im geräteempfindliche Bereich aufgelöst werden.

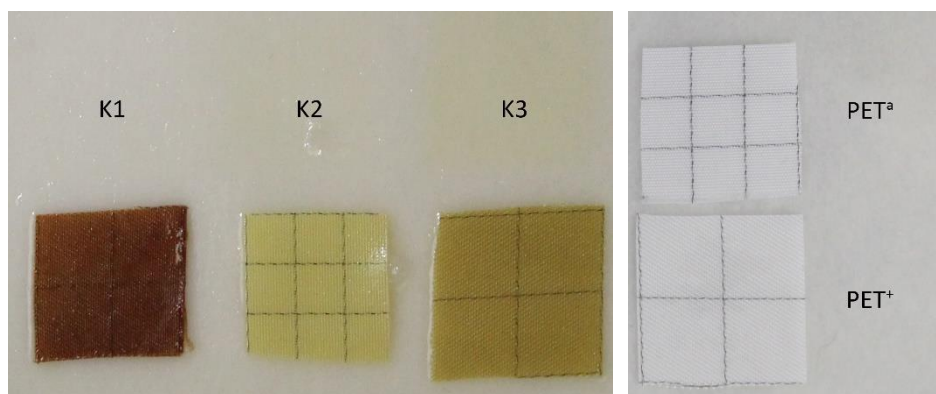


Abb. 5.2-3 Foto der drei kovalent unterschiedlich funktionalisierten Proben K1 bis K3 und ihrer entsprechenden Farbabdrücke nach 48-stündiger Lagerung auf nassem FP (links). Rechts: Foto der ungefärbten Textilsubstrate PET⁺ und PET^a.

In Extraktionsversuchen zeigen nur die Proben K2 und K3 ein leichtes Bluten im Verhältnis $K3 > K2$ nach 48-stündiger Nasslagerung auf FP (Abb. 5.2-3). Bei keiner der drei Proben konnte eine PS-Extraktion durch EtOH festgestellt werden. Auf Basis dieser Ergebnisse kann auf eine erfolgreiche dominierend kovalente Anbindung des TriMPyP geschlossen werden. Am farbintensivsten ist hierbei die Färbung des PES⁺-Gewebes bei 130 °C einzustufen (Probe K1).

5.2.3 Photosensibilisator-Fluoreszenz nach kovalenter Funktionalisierung

Die Intensität der Fluoreszenzsignale der kovalent funktionalisierten Proben folgt dem visuellen Farbeindruck im Verhältnis $K1 \gg K3 > K2$ (Abb. 5.2-4).

Aufgrund der geringen Streuung der Textiloberflächen konnte der zufällige Justagefehler auf maximal 10 % des Gesamtsignals abgeschätzt werden. Die Standardabweichung der gemittelten Gesamtemission beträgt knapp 15 % für die Probe K1 und maximal 5 % für die anderen beiden Proben. Der Anteil der zweiten harmonischen des Anregungslichts wird dabei vernachlässigt. Ein Intensitätsgradient ist in der Messung nicht zu erkennen, sodass die Fluoreszenzscans den homogenen Farbeindruck bestätigen. Wie erwartet, zeigen diese Spektren im Gegensatz zur Fluoreszenz des frei gelösten TriMPyP eine deutlich ausgeprägte Bandenstruktur. Die Lokalisation der Maxima der Fluoreszenzbanden ist für alle drei Proben gleich. Jedoch können wie schon bei den funktionalisierten Mikrofiltrationsmembranen unterschiedliche relative Intensitätsverhältnisse der beiden Schwingungsbanden der Proben K1 und K3 im Vergleich zu Probe K2 beobachtet werden. Das kann auf unterschiedliche Kopplungsmechanismen bzw. Lokalisierung des PS im Substrat hindeuten.

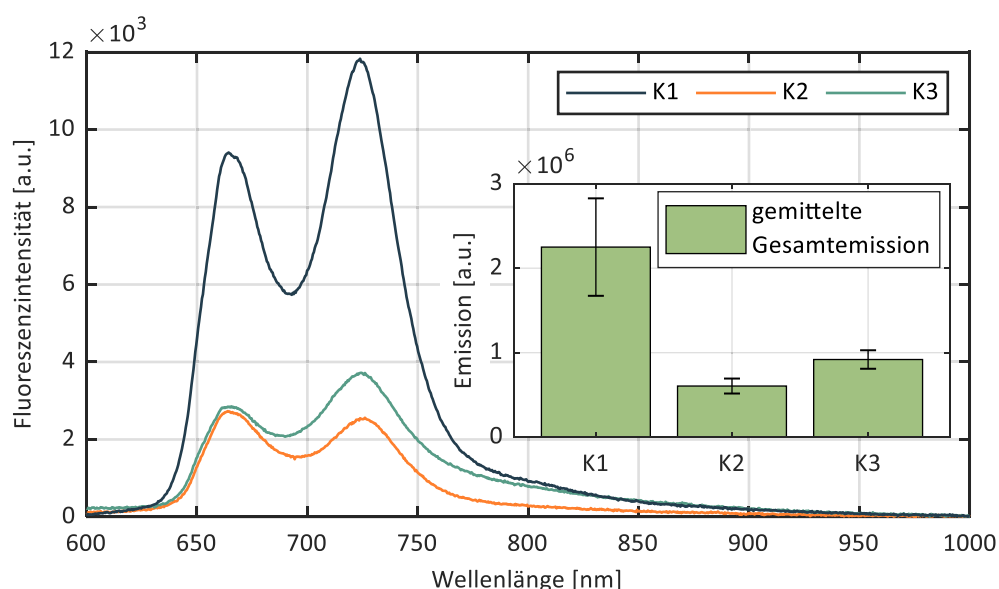


Abb. 5.2-4 Nachweis der TriMPyP-Fluoreszenz auf den drei kovalent funktionalisierten Oberflächen (K1 bis K3) im 2D-Fluoreszenzscan: Fluoreszenzspektren und die zugehörige Gesamtemission (Balkendiagramm). Im Diagramm wurde jeweils die integrierte Gesamtemission von 600 bis 1000 nm über einen Scan von 6×6 Pixeln (1 mm Schrittweite) gemittelt. Die Fehler wurden aus der Standardabweichung ($n=36$) und Justagegenauigkeit abgeschätzt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die photophysikalische Aktivität des TriMPyP im Sinne seiner Eigenschaft zur Fluoreszenzemission nach der kovalenten Anbindung an das Textilsubstrat erhalten bleibt. Es finden sich keine Hinweise auf eine Fluoreszenzlöschung durch PS-Aggregation.

5.3 Charakterisierung der textiltechnologischen TMPyP-Immobilisierung

Analog zum letzten Abschnitt werden im Folgenden die textiltechnologisch funktionalisierten Gewebeproben I1nb, A1nb und A2nb charakterisiert. Da es sich um keine kovalente Kopplung des PS handelt, ist von einer geringeren Bindungsstabilität auszugehen. Im Fokus der Untersuchungen liegt zunächst die Bewertung der beiden textiltechnologischen Verfahren auf ihre allgemeine Eignung zur TMPyP-Immobilisierung. Außerdem ist die Untersuchung der photophysikalischen Aktivität nach Funktionalisierung, insbesondere seine $^1\text{O}_2$ -Generierung und PDI-Wirksamkeit von besonderer Relevanz. Nur wenn diese Parameter zufriedenstellend sind, kann für den Fall einer unzureichenden PS-Immobilisierung eine Optimierung der Nachbehandlungsmethoden in Betracht gezogen werden.

5.3.1 TMPyP-dotierung und Bindungsstabilität

Durch die Verwendung des Bindersystems zeichnet sich die Probe I1nb durch eine etwas steifere Haptik und geringfügig schlechtere Wasserbenetzbarkeit aus. Die anderen beiden Proben zeigen hingegen keinen Unterschied zu dem ungefärbten Substratgewebe (PET⁺).

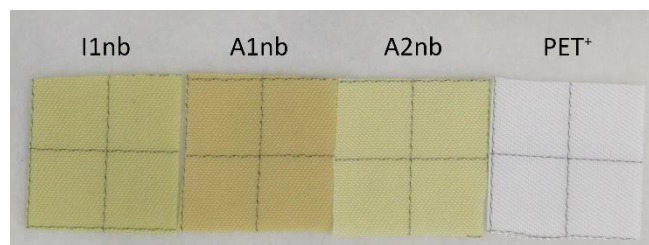


Abb. 5.3-1 Textiltechnologisch funktionalisierte Proben und ungefärbtes Substratgewebe (PET⁺). Bezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbt und nachbehandelt), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbt und nachbehandelt).

Die textiltechnologische Färbung der PET⁺-Gewebe weist eine homogene PS-Einfärbung mit nur leichten Unterschieden bei dem Eindruck der Farbtiefe auf: A1nb > I1nb > A2nb (Abb. 5.3-1). Durch die höhere Prozesstemperatur ist die Färbung im Ausziehverfahren der Probe A1nb stärker als bei Probe A2nb. Das war zu erwarten, da sich die Färbetemperatur der Probe A2nb an der unteren Schwelle zur Faseröffnung, die für das Verfahren essentiell ist, befindet [311].

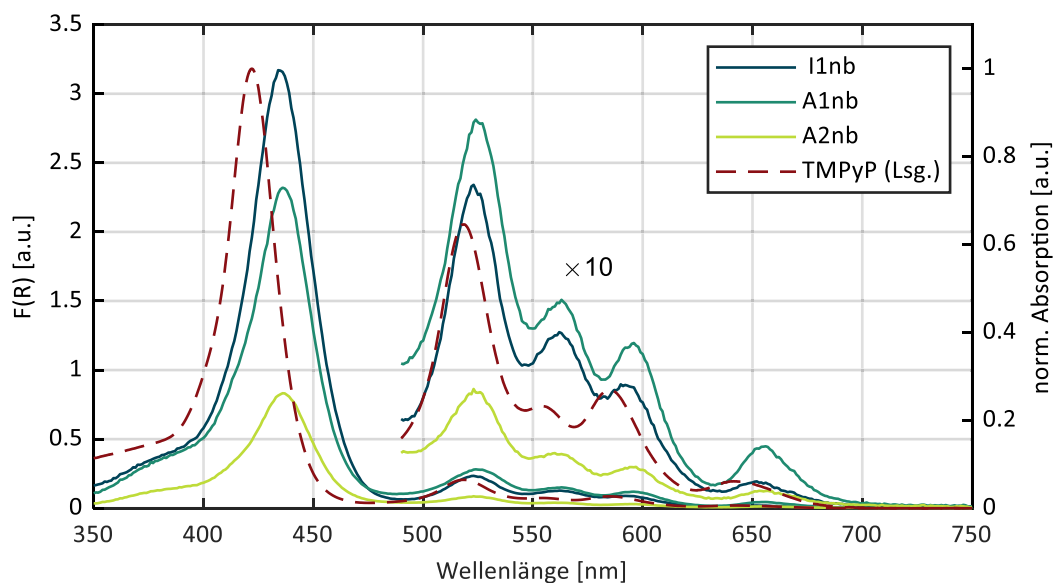


Abb. 5.3-2 Kubelka-Munk-Funktion der DRUV-Spektren der textiltechnologisch funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zum Absorptionsspektrum des frei gelösten TMPyP (in H_2O). Die Q-Banden sind zehnfach vergrößert dargestellt. Die Reflexionsmessungen erfolgten gegen unbehandeltes PES⁺-Gewebe als Standard. Probenbezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbte nachbehandelte Proben), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte und nachbehandelte Proben)

In Abb. 5.3-2 sind die DRUV-Spektren der textiltechnologisch funktionalisierten Proben dargestellt. Für alle drei Proben ist ein charakteristisches TMPyP-Absorptionsspektrum erkennbar. Gegenüber TMPyP in wässriger Lösung weisen die Reflexionsspektren eine bathochrome Verschiebung von ca. 10 nm auf. Wie schon bei den funktionalisierten Membranen beobachtet (Kap. 4.2.2), ist dieser auf die veränderte Mikroumgebung und nicht auf eine Modifizierung des PS zurückzuführen. Insbesondere konnte in Referenzmessungen mit TMPyP-getränktem (in wässriger Lösung) Filterpapier und reinem Polyestergewebe die gleiche Verschiebung festgestellt werden (hier nicht dargestellt). Die Hypochromie und Verbreiterung der Soret-Banden können ebenfalls auf die Adsorption des TMPyP an die Textilfasern zurückgeführt werden [244, 286]. Die sonst hohe Ähnlichkeit der Reflexionsspektren mit einem typischen Absorptionsspektrum von frei gelöstem TMPyP liefert keine Hinweise auf eine PS-Aggregation – weder in den Systemen mit noch ohne Binder. Eine Normierung der DRUV-Spektren (hier nicht dargestellt) zeigt die gleiche Bandenbreite bei allen vier Proben. Ausgehend von der Kubelka-Munk-Darstel-

lung der Reflexionsspektren kann für die Probe A1nb eine ca. zwei bis dreifache Menge immobilisierten TMPyP im Vergleich zu Probe A2nb abgeschätzt werden. Durch die höhere Prozesstemperatur wird mehr TMPyP in die Textilfaser eingeschmolzen. Eine relative Quantifizierung des TMPyP auf Probe I1nb ist an dieser Stelle nicht ohne weiteres möglich, da für die Messung kein echter Standard – also ein *mit Binder* behandeltes PET⁺-Substrat ohne TMPyP-Färbung – vorlag. Dies wird dadurch gestützt, dass der stärkere Farbeindruck der Probe A1nb im Vergleich zu Probe I1nb nicht durch das Intensitätsverhältnis ihrer Reflexionsspektren bestätigt wird. Ausgehend von der intensiveren Orangefärbung der Probe A1nb wäre auch eine intensivere Soret-Bande zu erwarten gewesen.

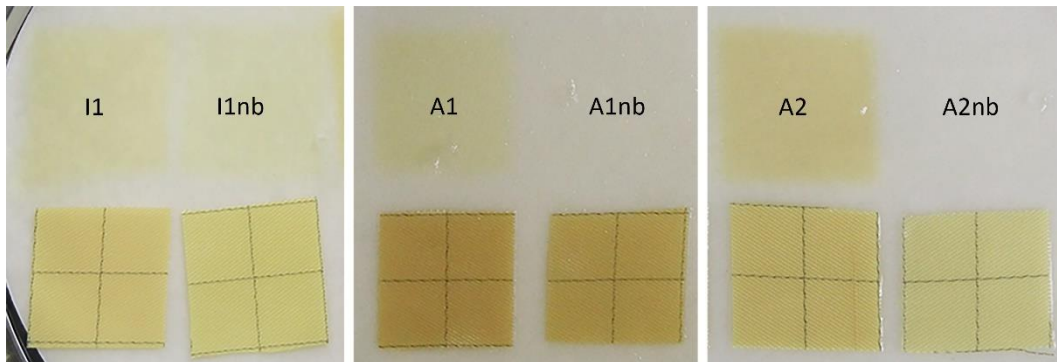


Abb. 5.3-3 Fotos der drei textiltechnologisch gefärbten und nachbehandelten (I1nb, A1nb, A2nb) bzw. nicht nachbehandelten (I1, A1, A2) Proben sowie der entsprechenden Farbabdrücke nach 48-stündiger Lagerung auf nassem FP. Probenbezeichnungen: I1 (im Imprägnierverfahren gefärbte Proben), A1 und A2 (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte Proben)

Die nass-chemische Nachbehandlung der Proben bildet einen ersten Nachweis der PS-Immobilisierung, da sie nicht fixierte Farbstoffe entfernt und dadurch die Waschechtheit erhöht. In Abb. 5.3-3 sind dazu die Farbabdrücke auf nassem FP nachbehandelter und nicht nachbehandelter Proben aufgeführt. Im Resultat zeigt lediglich die im Imprägnierverfahren gefärbte Probe I1nb eine leichte TMPyP-Extraktion nach 48-stündiger Nasslagerung auf FP. In EtOH konnte bei keiner der drei Proben eine TMPyP-Extraktion beobachtet werden. Insbesondere ist das für Probe I1nb der Fall, bei der sowohl die Verwendung eines Bindersystems als auch das reduktive Nachreinigen eine EtOH-Beständigkeit bedingen, wie in einem zusätzlichen Extraktionsversuch ermittelt werden konnte (Abb. 5.3-4).

Zusammenfassend erweisen sich beide Verfahren als geeignet, um TMPyP im Substrat zu immobilisieren. Lediglich die Extraktionsversuche auf nassem FP liefern Hinweise für eine weniger stabile Immobilisierung des PS auf Probe I1nb im Vergleich zur Färbung im Ausziehverfahren.

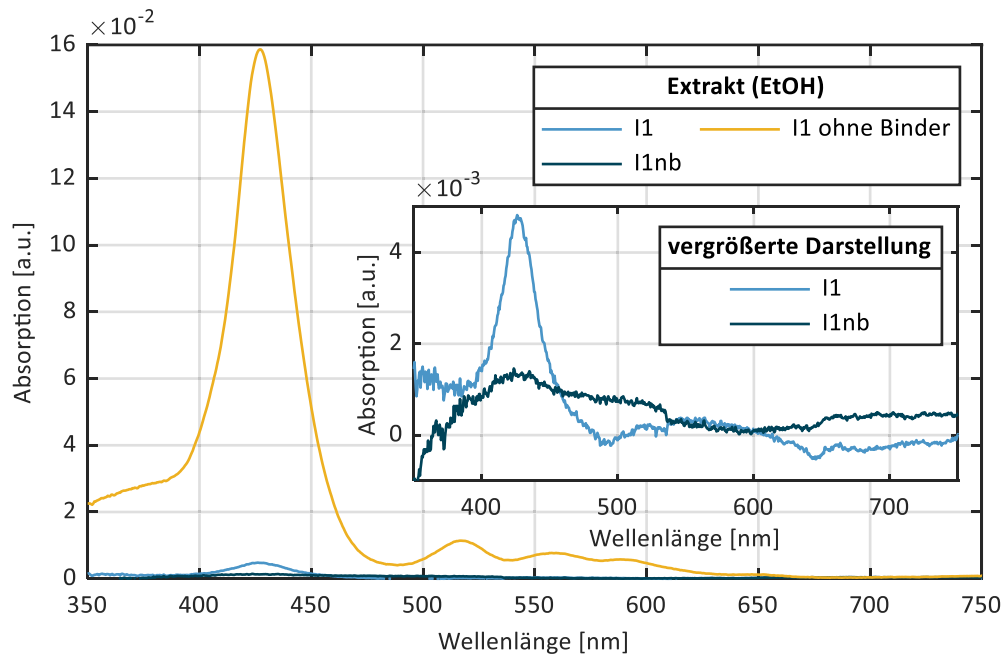


Abb. 5.3-4 Absorptionsspektren gemessen im EtOH-Extrakt nach 48-stündiger Inkubation (2,6 cm²-Gewebe in 6 ml EtOH) der im Imprägnierverfahren gefärbten und nachbehandelten Probe I1nb im Vergleich zu zwei nicht nachbehandelten Probenvarianten I1 (Färbung mit und ohne Bindersystem). Für die Proben I1 und I1nb ist zusätzlich ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt.

5.3.2 Photosensibilisator-Fluoreszenz nach textiltechnologischer Funktionalisierung

Alle drei textiltechnologisch funktionalisierten Gewebeproben zeigen eine deutliche TMPyP-Fluoreszenz mit zwei ausgeprägten Fluoreszenzbanden und unterschiedlicher Gesamtemission (Abb. 5.3-5). Innerhalb der Messgenauigkeit weisen die Banden keine relative Verschiebung auf. Jedoch zeigt die mit Bindersystem gefärbte Probe I1nb ein etwas anderes Bandenverhältnis. Das deutet auf eine andere dominieren Mikroumgebung des PS hin. Das TMPyP ist im Binder eingebettet – im Gegensatz zu den im Ausziehverfahren gefärbten Proben, bei denen der PS in die Gewebefasern eingeschmolzen ist. Die TMPyP-Emission ist im Scanbereich homogen verteilt mit einem Konfidenzintervall

von unter 6%. Aufgrund der strukturellen Äquivalenz der DRUV-Spektren, können aus der Gesamtemission Rückschlüsse auf die Fluoreszenzquantenausbeute des TMPyP auf den Probenoberflächen gezogen werden. Dabei folgt das Intensitätsverhältnis der im Ausziehverfahren gefärbten Proben ($A1nb/A2nb = 2,2 \pm 0,6$) der aus den DRUV-Spektren abgeschätzten PS-Menge. Die Fluoreszenzquantenausbeute dieser beiden Proben kann damit als gleich angenommen werden. Auffällig ist die im Vergleich zum visuellen Farbeindruck und den DRUV-Spektren geringe Emission der Probe I1nb. Das deutet auf eine geringere Fluoreszenzquantenausbeute hin und bestätigt die Annahme einer anderen dominierenden Mikroumgebung dieser Probe.

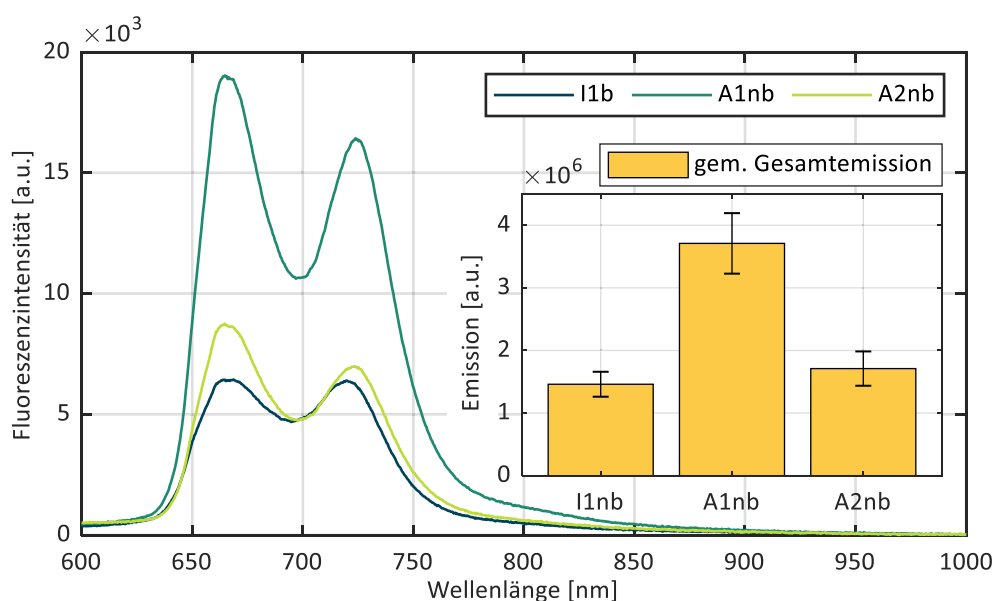


Abb. 5.3-5 Nachweis der TMPyP-Fluoreszenz auf den textiltechnologisch funktionalisierten Oberflächen im 2D-Fluoreszenzscan: Fluoreszenzspektren und die zugehörige Gesamtemission (Balkendiagramm). Im Balkendiagramm wurde jeweils die integrierte Gesamtemission von 600 bis 1000 nm über einen Fluoreszenzscan von 6×6 Pixeln (1 mm Schrittweite) gemittelt. Die Fehlerbalken wurden aus der Standardabweichung ($n=36$) und Justagegenauigkeit abgeschätzt. Probenbezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbte nachbehandelte Proben), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte und nachbehandelte Proben)

Im Rahmen der Fluoreszenzemission bleibt auch bei den beiden textiltechnologischen Verfahren die photophysikalische Aktivität des PS erhalten. Dabei zeigt die am intensivsten gefärbte Probe A1nb auch das intensivste Fluoreszenzverhalten. Es finden sich keine Hinweise auf eine Fluoreszenzlöschung durch TMPyP-Aggregation.

5.4 Vergleich der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz beider Funktionalisierungsansätze

Im Folgenden werden die zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignale an den sechs gefärbten Textiloberflächen untersucht und miteinander verglichen. Ein besonderes Augenmerk ist hierbei neben der allgemeinen Fähigkeit der Proben zur $^1\text{O}_2$ -Generierung, auf die $^1\text{O}_2$ -Signalkinetik bei veränderten Mikroumgebungen (nass/trocken) zu legen. Daraus ergeben sich wichtige Hinweise auf die zu erwartende PDI-Aktivität der Proben.

Alle sechs Proben zeichnen sich durch deutliche $^1\text{O}_2$ -Signale mit charakteristischem An- und Abklingen der Kinetik aus (Abb. 5.4-1 und Abb. 5.4-2). Kontrollmessungen bei 1200 ± 15 nm (FWHM) weisen vernachlässigbare PS-Phosphoreszenzsignale auf, sodass eine Sauerstoffverarmung ausgeschlossen werden kann. Trotzdem werden die $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignale sowohl im Trocken- als auch Nasszustand (mit Ausnahme der nass gescannten Proben I1nb und K2) von sehr langen Abklingzeiten oberhalb von $50 \mu\text{s}$ dominiert. Wie schon für den Fall der Mikrofiltrationsmembranen ausführlich diskutiert, können hierbei das $^1\text{O}_2$ -Abklingen an Luft als auch ein möglicher diffusionsbegrenzter Sauerstofftransport verantwortlich gemacht werden. Die mesoskopische Substratmorphologie ist dabei als ähnlich zu den porösen Membranen einzustufen, da es sich bei den PET-Substraten um verwobene Multifilamentgarne handelt. Eine vom Offset unabhängige Betrachtung zeigt zunächst grob dem visuellen Farbeindruck und den Fluoreszenzscans folgende Signalgesamtheiten im Verhältnis $A1nb > K1 > A2nb > I1nb \approx A2nb > K3 \geq K2$. Ein zusätzliches $^1\text{O}_2$ -Quenching, z. B. durch den Binder der Probe I1nb, kann somit ausgeschlossen werden. Die teilweise drastischen Unterschiede im Abklingverhalten der Proben im Nass- und Trockenzustand, wie sie in der normierten Darstellung besonders deutlich werden, erlauben Rückschlüsse auf die PS-Lokalisation im Substrat. Diese wird im Folgenden für die textiltechnologisch und kovalent modifizierten Proben getrennt betrachtet.

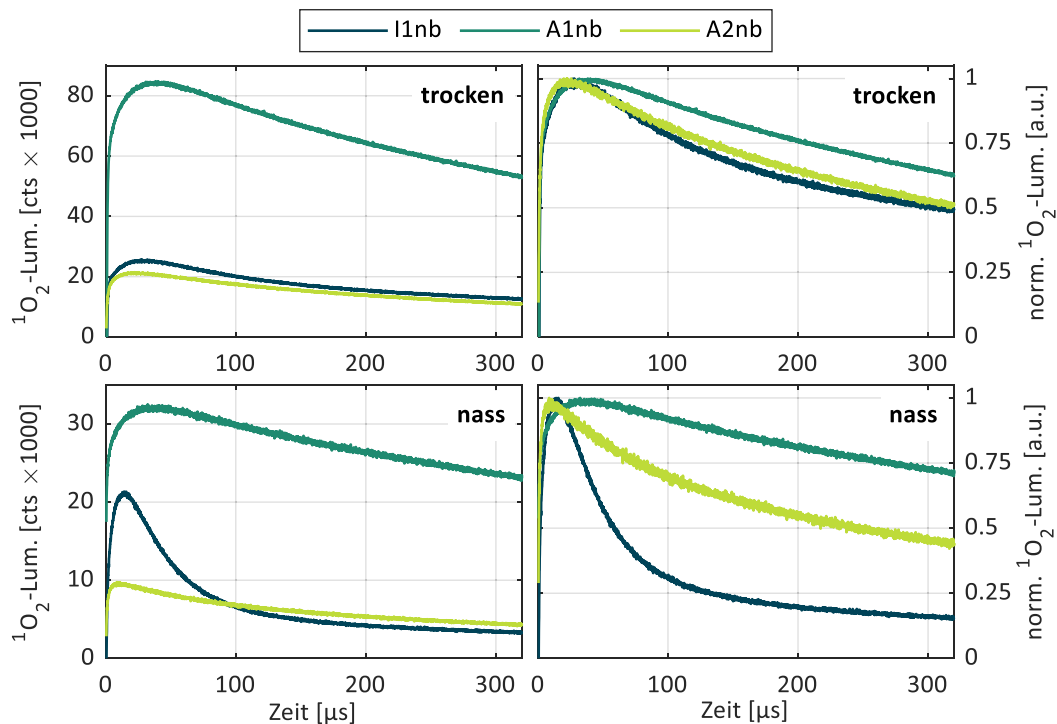


Abb. 5.4-1 Zeitaufgelöster $^1\text{O}_2$ -Nachweis auf den textiltechnologisch (I1nb: Imprägnierverfahren, A1nb und A2nb: Ausziehverfahren) funktionalisierten Probenoberflächen in Abhängigkeit der Mikroumgebung (trocken/nass). Es wurden 6×6 -Pixel-Raster à 1 mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale wurden über alle 36 Messpixel aufsummiert. Rechtseitig sind die auf das Maximum normierten Signale dargestellt.

Im Fall der textiltechnologisch funktionalisierten Gewebe (Abb. 5.4-1) zeigt die bei 130 °C im Ausziehverfahren gefärbte Probe A1nb sowohl das mit Abstand intensivste Gesamtsignal als auch langsamste Abklingverhalten. Das kann einerseits auf die größere PS-Menge, andererseits tiefer im Substrat eingeschmolzenes TMPyP mit einer resultierenden höheren strahlenden Ratenkonstante und längeren Abklingkinetik zurückgeführt werden. Besonders die $^1\text{O}_2$ -Signale dieser Probe im Nasszustand zeigen, dass die Kinetik durch die wässrige Mikroumgebung nur wenig beeinflusst wird, der PS also tief im Substrat lokalisiert ist. Dabei ist zu beachten, dass das PET per se hydrophob ist, tief innerhalb einer Faser *sitzendes* TMPyP also nur schwer durch Wassermoleküle erreicht werden kann. Im Gegensatz zu Probe A1nb reagiert die Signalkinetik der im gleichen Verfahren jedoch bei tieferen Temperaturen gefärbten Probe A2nb sensibler auf die im Nasszustand durchgeführte Messung. Die Probe hat zwar eine insgesamt geringere PS-Menge, jedoch ist das TMPyP weniger tief in die Faser eingeschmolzen. Den größten Einfluss durch das $^1\text{O}_2$ -

Quenching an H₂O erfährt die mit Binder foulardierte Probe I1nb. Somit zeichnet sich die Färbung mit Binder trotz der schlechteren Wasserbenetzbarkeit durch eine bessere Erreichbarkeit der TMPyP-Moleküle durch umgebendes Wasser aus. Das TMPyP scheint überwiegend an der Substratoberfläche lokalisiert zu sein.

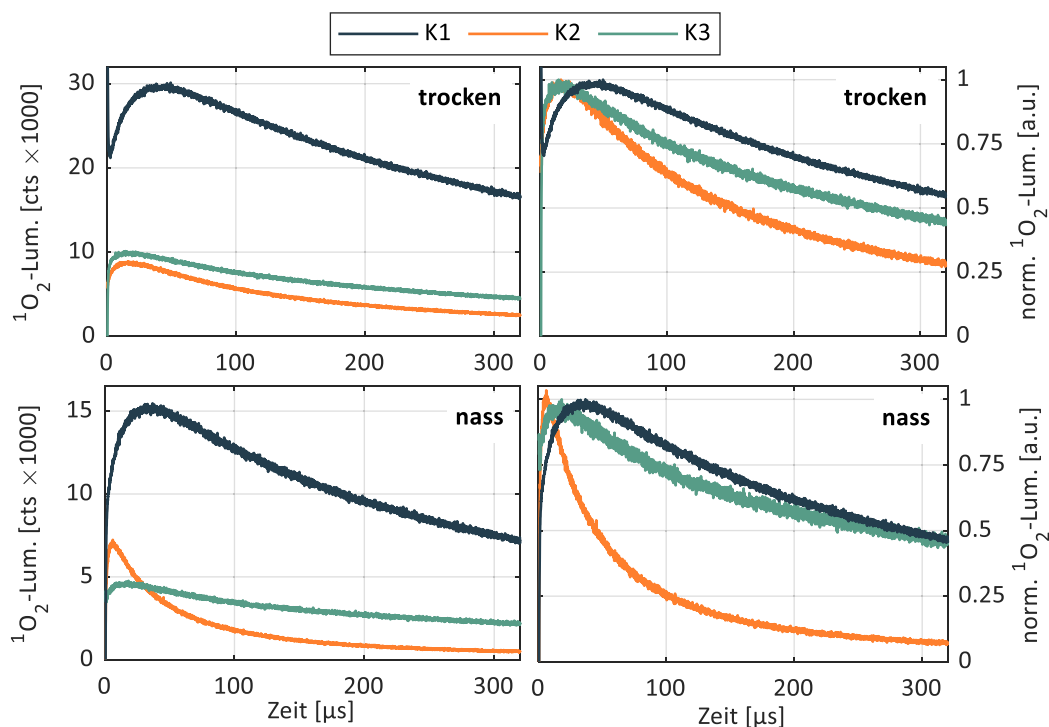


Abb. 5.4-2 Zeitaufgelöster ¹O₂-Nachweis auf den drei kovalent (K1 bis K3) unterschiedlich funktionalisierten Probenoberflächen in Abhängigkeit der Mikroumgebung (trocken/nass). Es wurden 6 x 6-Pixel-Raster à 1 mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale wurden über alle 36 Messpixel aufsummiert. Rechtseitig sind die auf das Maximum normierten Signale dargestellt.

Bei den kovalent funktionalisierten Proben (Abb. 5.4-2) zeigen die ¹O₂-Lumineszenzsignale trotz eines nominell gleichen Kopplungsmechanismus deutliche Unterschiede in der Signalkinetik und damit unterschiedliche dominierende Mikroumgebungen. Im Trockenzustand zeigt die am intensivsten eingefärbte Probe K1 auch das intensivste ¹O₂-Signal und das längste Abklingen. Die Proben K2 und K3 weisen eine ähnliche Signalintensität auf, wobei letztere Probe ein längeres Abklingen zeigt. Im Nasszustand lässt sich nur bei der Probe K2 eine deutliche Kinetikänderung mit kürzerem An- und Abklingen feststellen. Im Gegensatz dazu zeigt die normierte Darstellung der Proben K1

und K3 nur marginale Unterschiede von nass und trocken durchgeführten Scans. Insgesamt lassen sich die Signale grob so deuten, dass die dominierende Mikroumgebung und damit Lokalisation des PS in einem Gradienten Faser-oberfläche zu Faserinneres wie folgt einzuordnen ist:

Faseroberfläche K2 → K3 → K1 Faserinneres

Diese Lokalisierung lässt sich durch die Substrateigenschaften einerseits und die Prozesstemperatur andererseits begründen. Die alkalische Vorbehandlung des PET bei 100 °C (Probe K2) bewirkt ein *Abschälen* der Textilfasern [310, 312], sodass nur die Faseroberfläche aktiviert wird und für eine kovalente Anbindung zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu kann im kationisch färbbaren PET⁺-Substrat der gesamte Faserquerschnitt für eine Anbindung genutzt werden, vorausgesetzt der PS dringt tief genug in die Faser durch. Die tiefere PS-Lokalisierung bei der Probe K3 im Vergleich zu Probe K1 lässt sich dabei mit der höheren Temperatur und durch ein tieferes Einsmelzen des TriMPyP in die Textilfasern erklären, wie schon bei den textiltechnologisch im Ausziehverfahren funktionalisierten Proben A1nb und A2nb beschrieben. Wie die Nassscans verdeutlichen, ist dieser Einfluss jedoch gering. Die überwiegend oberflächliche Lokalisierung des PS bei der Probe K2 wird vor allem bei den an nassen Proben durchgeführten ¹O₂-Lumineszenzscans deutlich. Nur diese Probe zeigt ein eindeutiges physikalisches Quenching durch die Wassermoleküle. Zusätzlich ist nicht auszuschließen, dass das Quenching durch die bessere Wasserbenetzbarkeit des Gewebes begünstigt wird, da durch die Alkalisierung die unmittelbare Faseroberfläche hydrophilisiert wird [310].

Anhand der relativen Signalintensität des ¹O₂-Nachweises aber vor allem der normierten Darstellung der an nassen Proben durchgeführten Lumineszenzscans lässt sich eine Einschätzung zur PDI-Aktivität der Proben postulieren. Die zugrundeliegende Annahme ist, dass erst bei Änderung der Signalkinetik im ¹O₂-Lumineszenzscan infolge veränderter Mikroumgebung (nass/trocken), eine biologische Wirksamkeit des generierten ¹O₂ erwartet werden kann. Es ist davon auszugehen, dass die Probe I1nb die besten phototoxischen Eigenschaften aufweisen wird, gefolgt von Probe A2nb und K2. Bei den anderen Proben ist eine PDI unwahrscheinlich, da der PS zu tief im Substrat sitzt. Bei der

Einschätzung muss jedoch beachtet werden, dass eine PDI durch unzureichend gebundene PS-Moleküle, wie sie bei den Mikrofiltrationsmembranen beobachtet wurde, möglich ist. Dies betrifft insbesondere die Proben K3 und I1nb, die nachweislich eine PS-Extraktion auf nassem FP aufweisen (Abb. 5.2-3 und Abb. 5.3-3).

5.5 Phototoxizität der Textilproben

Die PDI der sechs Textilproben wurde in einem Handtest mit dem Luftkeim *M. luteus* semiquantitativ bestimmt und zusätzlich auf Basis von Plattenauszahlversuchen mit dem *E. coli* quantifiziert. In beiden Versuchsreihen erfolgte die Bestrahlung für eine Stunde mit $11 \pm 2 \text{ mW/cm}^2$ – d.h. mit annähernd der gleichen Beleuchtungsstärke wie vergleichbare Versuche mit funktionalisierten Mikrofiltrationsmembranen. Der Handtest mit dem *M. luteus* wurde unter trockenen Bedingungen durchgeführt, d.h. die inokulierten Proben wurden vor Bestrahlung für ca. zwei Stunden im dunklen getrocknet. Die Auswertung erfolgte nach zweitägiger Probeninkubation auf LB-Agar unter Lichtausschluss. Die Bestrahlung der mit dem *E. coli* inkubierten Proben erfolgte unmittelbar nach Probeninokulation.

Tab. 5.5-1 Semiquantitative Auswertung des Handtests der Phototoxizität mit *M. luteus*. Als Nullprobe (NP) wurde ungefärbtes PET⁺-Substrat verwendet. Die grün markierten Proben werden als phototoxisch, die orange markierten als gering bis gar nicht phototoxisch eingestuft. Quantifizierung des Probenbewuchses mit dem *M. luteus*: 0 (kein Bewuchs sichtbar), +, ++, +++ (leichter, mittlerer und starker Bewuchs). Probenbezeichnungen: K1 bis K3 (kovalent funktionalisierte Proben), I1nb (Imprägnierverfahren), A1nb und A2nb (Ausziehverfahren)

	NP	I1nb	A1nb	A2nb	K1	K2	K3
dunkel	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
bestrahlt	+++	0	++	+	+++	+	+++

Die Ergebnisse des Handtest mit dem *M. luteus* können der Tab. 5.5-1 entnommen werden. Da der gelbe Luftkeim auf den ebenfalls gelben Proben im Foto schwer zu erkennen ist, wird der Versuch nur beispielhaft mit den textiltechnologisch funktionalisierten Proben in Abb. 5.5-1 illustriert. Für eine bessere Erkennbarkeit der Keime wurde der Bildkontrast nachträglich erhöht. Die semiquantitative Bewertung des Bakterienbewuchses erfolgte an den realen Proben auf einer vierstufigen Skala von *kein Bewuchs* bis *starker Probenbewuchs*, wie er auf der ursprünglich weißen Nullprobe im Foto gut zu erkennen ist. Im Ergebnis ist die bestrahlte Probe I1nb vollständig keimfrei, die Proben A2nb und K2 gut, die Proben A1nb und K3 schwach und die Probe K1 gar nicht phototoxisch. Keine der Proben ist dunkeltoxisch.

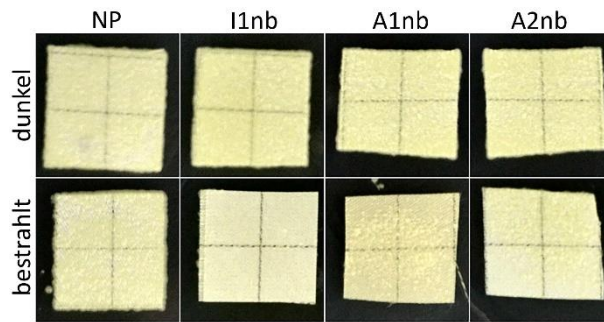


Abb. 5.5-1 Handversuch der Dunkel- und Phototoxizität: Exemplarische Fotos der mit *M. luteus* inkubierten Proben NP, I1nb, A1nb und A2nb. Für die Bestimmung der Phototoxizität wurden je Probe, jeweils vier Textil-Stücke mit 11 mW/cm^2 Weißlicht für 1 h bestrahlt. *M. luteus* ist ein gelber Keim und daher auf den ebenso gelben Textilproben schwer zu fotografieren. Die gelbe Farbe auf den Nullproben (ohne Keim weiß) stammt ausschließlich vom *M. luteus*. Probenbezeichnungen: NP (Nullprobe), I1nb (gefärbt im Imprägnierverfahren), A1nb und A2nb (gefärbt im Ausziehverfahren)

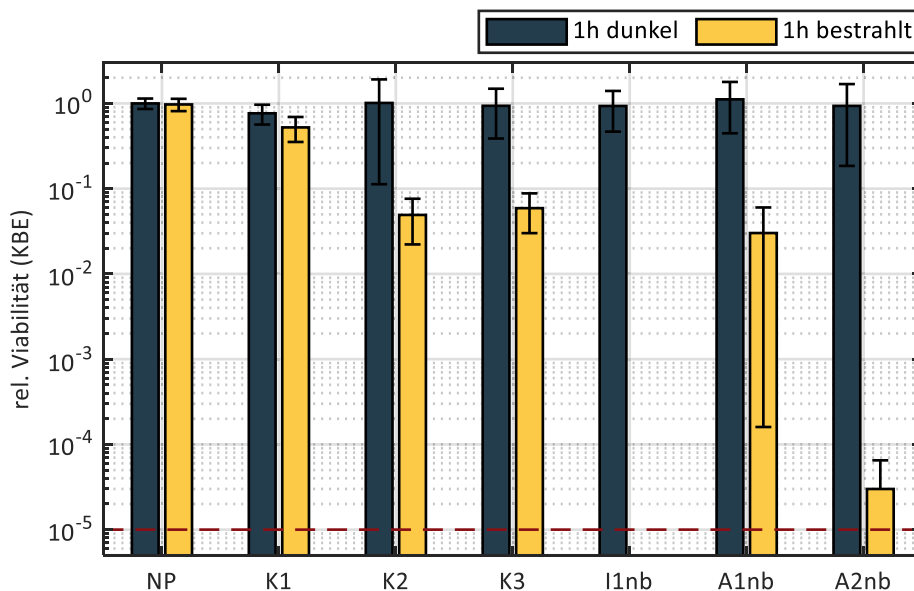


Abb. 5.5-2 PDI von *E. coli* auf allen sechs funktionalisierten Textilproben sowie der Nullprobe (NP) als Referenz. Die Bestrahlung mit Weißlicht erfolgte für eine Stunde bei $11 \pm 2 \text{ mW/cm}^2$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 18 Zählungen ($n=18$). Das Zähllimit ist gestrichelt markiert. Die relative Rate ist auf die dunkel inkubierte Nullprobe normiert. Probenbezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbte nachbehandelte Proben), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte und nachbehandelte Proben)

Die quantitative Auswertung der PDI gegen den *E. coli* (Abb. 5.5-2) zeigt eine im Rahmen des Versuches vollständige Keimabtötung auf der Probe I1nb von mindestens fünf Log₁₀-Stufen. Die Viabilitätsreduktion der Probe A2nb beträgt

ca. drei Log₁₀-Stufen, der drei Proben A1nb, K2 und K3 im Bereich von einer Log₁₀-Stufe. Die Probe K1 zeigt keinen phototoxischen Effekt. Keine der Proben ist dunkeltoxisch. Wegen der sehr effizienten Phototoxizität mit einer vollständigen Zellinaktivierung wurde die Probe I1nb zusätzlich einer Zeitabhängigen PDI-Untersuchung nach 5, 10 und 30 min unterzogen (Abb. 5.5-3). Dabei zeigt sich bereits nach zehnminütiger Bestrahlung eine deutliche Phototoxizität von zwei Log₁₀-Stufen. Nach 30 Minuten sind alle *E. coli* inaktiviert.

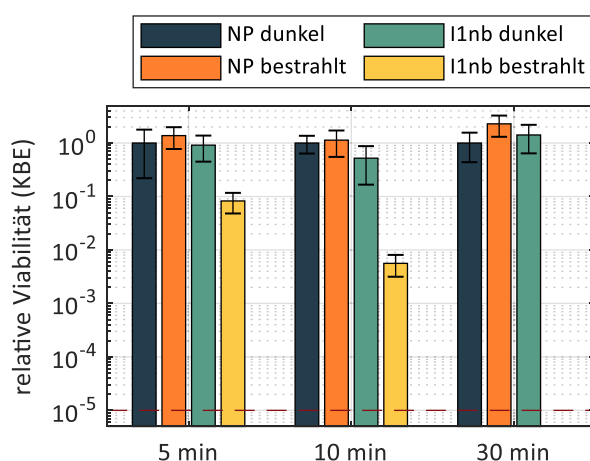


Abb. 5.5-3 PDI von *E. coli* auf der im Imprägnierverfahren gefärbten Probe I1nb sowie der Nullprobe (NP) als Referenz nach 5, 10 und 30 min. Die Bestrahlung erfolgte bei 11 ± 2 mW/cm². Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 12 Zählungen (n=12). Das Zähllimit ist gestrichelt markiert. Die relative Rate ist auf die dunkel inkubierte Nullprobe normiert.

Diese Ergebnisse bestätigen die auf Basis der ¹O₂-Lumineszenzkinetik-Untersuchungen postulierte PDI-Wirksamkeit der jeweiligen Proben. Im Rahmen des durchgeführten Zählversuchs sind die textiltechnologisch funktionalisierten Proben I1nb und A2nb antimikrobiell. Bei den kovalent funktionalisierten Proben zeigt die Probe K2 die insgesamt beste phototoxische Wirkung und bestätigt die Analyse der ¹O₂-Kinetik. Die jedoch deutlich schlechtere PDI-Aktivität im Vergleich zur Probe A2nb ist vermutlich auf die insgesamt geringere ¹O₂-Generierung zurückzuführen. Die zwar leichte, jedoch nachweisliche Phototoxizität der Probe K3 ist im Rahmen des Zählversuches mit dem *E. coli* überraschend – zumal diese Probe keinen Effekt gegen den *M. luteus* zeigte. Möglicher Grund ist eine PS-Extraktion durch den gramnegativen *E. coli*, der durch seine Zellwandstruktur eine höhere Affinität zum kationischen PS als der *M. luteus* aufweist. Dies wurde nicht näher untersucht, da die Phototoxizität im Vergleich zu den Proben A2nb und I1nb vernachlässigbar ist. Eine mögliche PS-Extraktion der PDI-wirksamsten Probe I1nb wird im nächsten Abschnitt untersucht.

5.6 PS-Extraktion und -Photostabilität des der antimikrobiellen Probe I1nb

Ausgehend von den Extraktionsversuchen auf nassem FP und der guten phototoxischen Wirkung, wurde die Probe I1nb zwei zusätzlichen Extraktionsversuchen mit *E. coli* unterzogen (Kap. 5.6.1). Ziel war es herauszufinden, ob die PDI teilweise durch extrahiertes TMPyP verursacht wird, wie es bereits für die funktionalisierten Membranproben gefolgert wurde (Kap. 4.4). Für eine abschließende Einschätzung der Probe I1nb auf Eignung als antimikrobiell einsetzbares Textil wurde sie ergänzend hinsichtlich der Photostabilität des immobilisierten TMPyP untersucht (Kap. 5.6.2).

5.6.1 TMPyP-Extraktion mit *E. coli*

Analog zu den Versuchen mit den Membranen wurden Absorptionsmessungen im PBS-Bakterien-Extrakt der nullten Verdünnungsstufe eines quantitativen PDI-Experiments nach M&M mit *E. coli* und Messungen am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Im Absorptionsspektrum ließ sich im Rahmen der Messgenauigkeit keine durch den *E. coli* verursachte PS-Extraktion feststellen, auf eine Darstellung wird hier verzichtet.

Die Ergebnisse der CLSM-Messungen sind inkonklusiv. Im Gegensatz zu den Mikrofiltrationsmembranen war es nicht möglich sowohl Bakterien als auch Textilsubstrat in einer Fokusebene abzubilden. Grund ist vermutlich die Abwesenheit eines Kapillareffektes, der wie bei den porösen Membranen für ein Ansaugen der Bakteriensuspension an die unmittelbare Probenoberfläche sorgt. Außerdem hat sich gezeigt, dass die wirkenden Adhäsionskräfte auf die Bakterien vom Objektträger dominiert werden. In der Fokusebene der Bakterien zeigen sich jedoch einige Hinweise für eine potentielle TMPyP-Extraktion (Abb. 5.6-1). Mit steigender Inkubationsdauer kann eine Kolo-kalisierung von TMPyP-Fluoreszenz und Bakterien festgestellt werden. Diese ist aber nur auf einen Bruchteil der Bakterien (im dargestellten Bildausschnitt sind es z. B. weniger als 5 %) beschränkt. Bemerkenswert ist, dass dieser Effekt mit fortschreitender Inkubation immer nur die gleichen Zellen betrifft, deren Emission zunimmt, und nicht eine steigende Zahl von Zellen, wie es bei den Mikrofiltrationsmembranen der Fall ist. Am wahrscheinlichsten ist, dass es sich hierbei um nicht mehr intakte Zellen handelt. Deren im Zellinnern freiliegende

DNS weist eine starke TMPyP-Anziehung auf und sorgt für eine höhere Fluoreszenzintensität [301]. Da die Proben zwischen den Messungen dunkel inkubiert wurden, konnte auch nach weiteren 30 Minuten keine Zunahme des Anteils der betroffenen Zellen beobachtet werden.

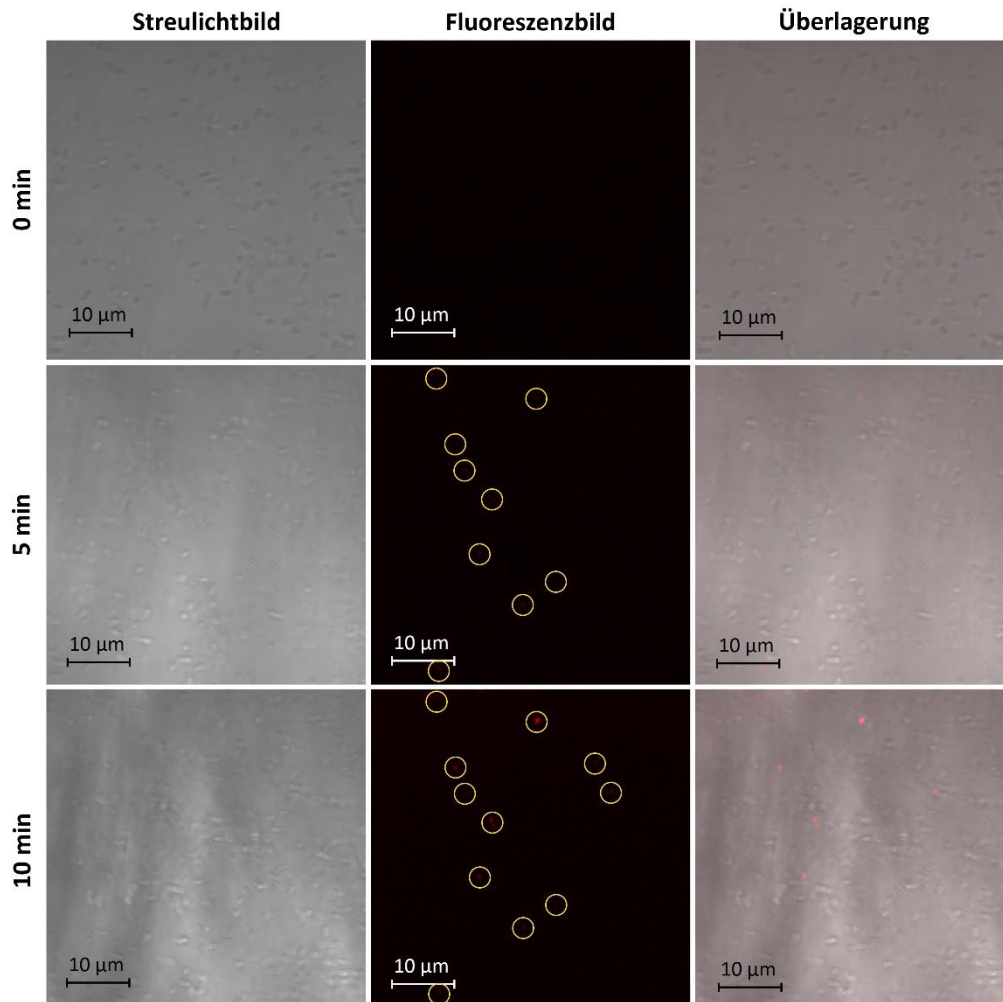


Abb. 5.6-1 Fluoreszenz- und Streulichtaufnahmen der mit Bakteriensuspension ($10 \mu\text{l}$ mit 10^8 KBE/ml *E. coli* in PBS) inokulierten im Imprägnierverfahren gefärbten Probe I1nb – Anregung bei 405 nm, Emission bei 650 bis 750 nm. Die Aufnahmen erfolgten im gleichen Bildausschnitt unmittelbar nach Inokulation (obere Bildreihe) und 5 bis 10 min später (untere Bildreihen). Die lokalisierten Fluoreszenzspots wurden zur besseren Erkennbarkeit gelb umrandet.

Auf Basis dieser Ergebnisse ist eine TMPyP-Extraktion durch Bakterien nicht ausgeschlossen, jedoch erscheint ein PDI-relevanter Einfluss unwahrscheinlich, da zumindest in der Fokusebene stets die gleichen Zellen betroffen sind.

5.6.2 TMPyP-Photostabilität des Textilgewebes

Die Photostabilität der Probe I1nb wurde im Trockenzustand unter Normalbedingungen (20 °C und 50 % rel. Luftfeuchtigkeit) in einem 8h-an-16h-aus-Regime getestet, was einen Arbeitstag simulieren sollte. Die verwendete Beleuchtungsintensität von $11 \pm 2 \text{ mW/cm}^2$ wurde analog zu den oben durchgeführten PDI-Versuchen gewählt. Innerhalb von 15 Tagen nimmt die Fluoreszenzemission des TMPyP um maximal 40 % ab und es zeigt sich ein augenscheinliches Ausbleichen der Proben (Abb. 5.6-2 links). Trotz einer vergleichbaren Lichttagesdosis erweist sich die Textilprobe I1nb damit als deutlich lichtbeständiger als die untersuchten TMPyP-dotierten Membranen (Kap. 4.5). Auffällig ist, dass die Abnahme der TMPyP-Emission einer anderen Kinetik folgt als im Fall der Membranen (Abb. 4.5-2) und nach einem sechs- bis acht-tägigen Plateau verzögert auftritt. Auch nach 15 Tagen sind die Proben dazu in der Lage $^1\text{O}_2$ zu generieren (Abb. 5.6-2 rechts). Im Resultat zeigten ebendiese Proben im PDI-Versuch mit *E. coli* eine Zellinaktivierung von mindestens zwei Log_{10} -Stufen im Vergleich zu mindestens fünf Log_{10} -Stufen bei den nicht auf Photostabilität geprüften Proben. Damit wurde die PDI-Wirksamkeit der I1nb-Proben auch nach mindestens 15 Tageszyklen bestätigt.

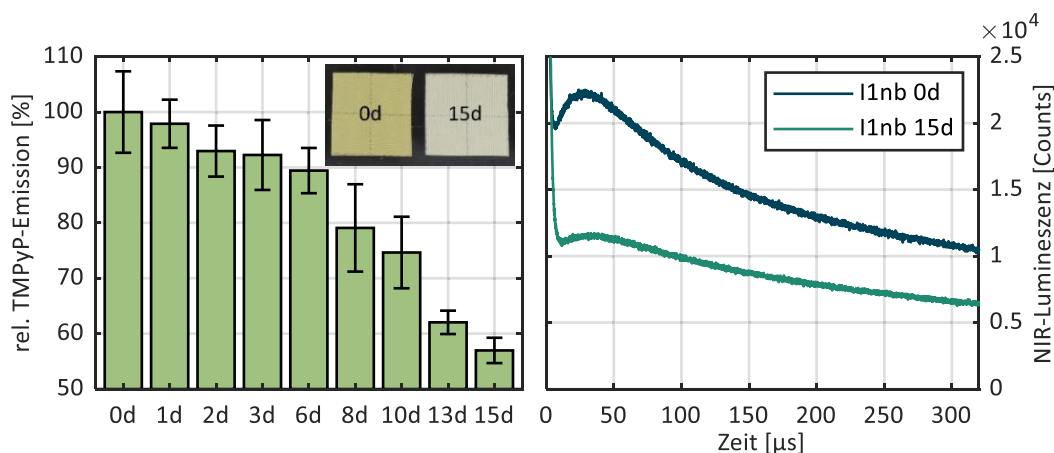


Abb. 5.6-2 Links: Relative TMPyP-Emission (600 bis 1000 nm) der Proben I1nb nach bis zu 15-tägiger Bestrahlung im 8h-an-16h-aus-Regime mit $11 \pm 2 \text{ mW/cm}^2$. Die Werte sind auf die erste Messung (0d) normiert, die entsprechenden Fehlerbalken resultieren aus Standardabweichung (36 Messpixel) und Fehlerfortpflanzung. Im überlagerten Foto sind eine unbestrahlte und die zu 40 % ausgebleichte Probe nach 15 Tagen dargestellt. Rechts: NIR-Lumineszenz ($1270 \pm 15 \text{ nm FWHM}$) ebd. Proben nach 0d und 15d. Es wurden 6×6 -Pixel-Raster à 1 mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale wurden über alle 36 Messpixel aufsummiert.

5.7 Zusammenfassende Bewertung

In diesem Kapitel wurden funktionalisierte Polyestergewebe photophysikalisch charakterisiert und auf ihrer Eignung zur PDI-aktiven antimikrobiellen Ausrüstung von Textilien untersucht. Es wurden zwei Funktionalisierungsansätze verglichen: eine kovalente Kopplung mit TriMPyP (Proben K1 bis K3) und eine textiltechnologische Färbung mit TMPyP (Proben I1nb, A1nb und A2nb). Der textiltechnologische Ansatz zeigt sich dabei als weit überlegen. Einerseits ist die Funktionalisierung deutlich einfacher (jeweils ein Schritt für Färbung und Nachbehandlung), günstiger und ohne weiteres skalierbar. Andererseits zeigen nur diese Proben eine hinreichende PDI-Aktivität, um als antimikrobiell eingestuft werden zu können.

Die photophysikalische Charakterisierung zeigt, dass bei allen sechs Proben der PS nach der Funktionalisierung intakt bleibt und seine Eigenschaft zur Fluoreszenzemission und $^1\text{O}_2$ -Generierung beibehält. Insgesamt korrelieren die Messergebnisse, insbesondere die zeitaufgelöste $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz, mit den jeweiligen Funktionalisierungs- bzw. Färbeparametern. Die Messungen der zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz an den Probenoberflächen bestätigen, dass für die unterschiedliche PDI-Aktivität neben der Menge des immobilisierten PS bzw. des generierten $^1\text{O}_2$ vor allem auch die PS-Lokalisation im Substrat verantwortlich ist. Es zeigt sich, dass für eine PDI-wirksame Funktionalisierung des PET-Gewebes u.a. die Prozesstemperatur ausschlaggebend ist, wie am Beispiel der im Ausziehverfahren gefärbten Proben deutlich wird. Erst die Reduktion der Färbetemperatur von 130 auf 98 °C bei der Probe A2nb im Vergleich zur Probe A1nb führt zu einem phototoxischen Textil. Trotz der um mindestens den Faktor zwei geringeren PS-Einfärbung ist das TMPyP überwiegend an der Faseroberfläche lokalisiert. Nur dort kann es biologisch wirksam werden, wie sich anhand der $^1\text{O}_2$ -Kinetik bei trocken und nass durchgeführten NIR-Lumineszenzscans nachvollziehen lässt. Die in diesem Sinne *besten* $^1\text{O}_2$ -Eigenschaften und höchste PDI-Aktivität zeigt die im Imprägnierverfahren mit Bindersystem gefärbte Probe I1nb: seine $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik wird im Vergleich zu allen anderen Textilproben am stärksten von einer veränderten Mikroumgebung (nass/trocken) beeinflusst. Im Gegensatz zu den im Ausziehverfahren gefärbten Proben ist das TMPyP im Binder eingebettet, der bei Raumtemperatur als Funktionsschicht auf die unmittelbare Gewebeoberfläche aufgetragen wird. Dabei wird der im Binder eingeschlossene PS nicht von

äußeren Umwelteinflüssen isoliert. Insgesamt zeigen die hier durchgeführten Versuche, dass unabhängig vom Färbeverfahren des PET-Gewebes ein zu tiefes Eindringen des PS ins Faserinnere vermieden werden sollte. Dafür ist eine kritische Temperatur von knapp 100 °C bestimmend, da es ab 98 °C zu einer Faseröffnung der Polyesterfasern kommt [311]. Bei den kovalent gefärbten Proben K1, K2 und K3 zeigt sich eine sehr gute Immobilisierung des verwendeten PS TriMPyP. Trotz der um einen Faktor zehn geringeren PS-Konzentration als bei den textiltechnologischen Ansätzen, fällt die Textileinfärbung teilweise deutlich intensiver aus. Bestimmend für die Effizienz der PDI bleiben jedoch die Ergebnisse der zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz an den Probenoberflächen bei nasser und trockener Mikroumgebung. Hier zeigt sich, dass nur von dem Funktionalisierungsansatz bei dem die Faseroberfläche durch eine alkalische Vorbehandlung selektiv aktiviert wird und das TriMPyP bindet (Probe K2), auch eine phototoxische Wirkung erwartet werden kann. Das wird im Rahmen der PDI-Versuche vor allem für den grampositiven *M. luteus* bestätigt. Insgesamt bleiben die kovalent funktionalisierten Proben deutlich hinter den beiden textiltechnologisch modifizierten Proben I1nb und A2nb zurück. Es kann nicht genügend $^1\text{O}_2$ aus dem Substrat hinausdiffundieren und die einzige leicht phototoxische Probe K2 weist auch die vergleichsweise geringste Einfärbung auf. Somit ist ausschließlich der Funktionalisierungsansatz der Probe K2 als tauglich für eine kovalente PS-Kopplung einzustufen. Dabei könnten die Prozesstemperatur einerseits reduziert, die PS-Konzentration andererseits erhöht werden.

In den mit Bakteriensuspension durchgeführten Extraktionsversuchen konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die guten phototoxischen Eigenschaften der Probe I1nb zum Teil auch durch schlecht gebundenes TMPyP verursacht werden. Dieser Einfluss erscheint jedoch gering, wie die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen. Nur ein geringer Anteil der sichtbaren Bakterien extrahiert das TMPyP und bleibt vor allem im Verlauf der Inkubation unverändert. Damit unterscheidet sich diese Probe grundlegend von den TMPyP-dotierten Mikrofiltrationsmembranen, bei denen dieser Anteil zunimmt. Besonders hervorzuheben ist die Probe A2nb, bei der in keinem der durchgeführten Extraktionsversuche ein Bluten des PS nachgewiesen werden konnte. In PDI-Versuchen zeigt A2nb sowohl eine phototoxische Wirkung gegen den *M. luteus* als auch den *E. coli*, der um drei Log_{10} -Stufen inaktiviert

wird. Damit führt auch dieser Ansatz zu einem antimikrobiellen Textil gemäß der Richtlinien der Amerikanischen Gesellschaft für Mikrobiologie.

In der Untersuchung zur Photostabilität des TMPyP zeichnet sich die Probe I1nb durch eine hohe Beständigkeit aus. Trotz des gewählten Bestrahlungsregimes mit der maximalen zur Verfügung stehenden Beleuchtungsintensität ist die Probe auch noch nach 15 Tagen phototoxisch. In der Regel gehorcht das Ausbleichen eines PS einer Reaktion erster Ordnung mit einer exponentiellen Abnahme der photophysikalischen Aktivität [233, 232]. Dies konnte auch bei den funktionalisierten Membranen beobachtet werden. Da die hier beobachtete Fluoreszenzemission der Probe I1nb innerhalb der ersten sieben Tage annähernd konstant bleibt, ist nicht ausgeschlossen, dass im verwendeten Bindersystem TMPyP an die Oberfläche nachdiffundiert. Damit bestünde das Potenzial die Photostabilität durch die Verwendung einer dickeren Binder-PS-Schicht noch weiter zu verlängern.

Kapitel 6:

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die PDI und ihre stationäre Vermittlung auf selbstdesinfizierenden Oberflächen birgt zahlreicher Vorteile gegenüber klassischen Desinfektionsmethoden, wie z. B. ein geringes Resistenzpotenzial, ein breites Wirkspektrum und eine umweltschonende Wirkung. Für ihre Etablierung in Form von PDI-aktiven Oberflächen, insbesondere polymeren Oberflächen, mangelt es aktuell an kommerziell attraktiven Funktionalisierungsansätzen, d. h. der Möglichkeit einer Verwendung kommerzieller Substrate und/oder skalierbarer Methoden. In der vorliegenden Arbeit werden zwei derartige Ansätze vorgestellt und auf ihre prinzipielle Tauglichkeit hin überprüft. Im Rahmen der Promotion wurde eine systematisierte Methodik zur Bewertung und zielgerichteten Entwicklung funktionalisierter Oberflächen für die PDI erarbeitet. Zwei neue Aspekte sind dabei besonders hervorzuheben: Die Messung zeitaufgelöster $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzsignale bei gezielt veränderter Mikroumgebung und Extraktionsversuche unter PDI-relevanten Bedingungen mit Mikroorganismen. Im Folgenden werden die Ergebnisse zu beiden Funktionalisierungsansätzen – der e-Strahlvermittelten Funktionalisierung von Mikrofiltrationsmembranen für die Sterilfiltration und der textiltechnologischen Funktionalisierung von Polyester-textilien für Reinraumbekleidung – zusammengefasst und die relevanten Punkte der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessungen und Extraktionsversuche hervorgehoben.

Für die **e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung von Mikrofiltrationsmembranen** wurden zwei photophysikalisch ähnliche jedoch in ihrer PDI-Wirkung in frei gelöster Form gänzlich unterschiedliche PS verwendet: Das kationische TMPyP, das sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien phototoxisch wirkt, und das in seiner phototoxischen Wirkung in Suspension vernachlässigbare anionische TPPS. Die Wahl des TPPS sollte neben der Überprüfung des e-Strahl-Verfahrens mit zwei unterschiedlichen PS dem Umstand Rechnung tragen, dass die Wirkmechanismen der PDI durch auf Oberflächen immobilisierte PS nicht mehr in dem Maße Ladungsabhängig sein könnten, wie es in Suspension der Fall ist. Die hier zugrundeliegende Annahme lautete, dass der von der funktionalisierten Oberfläche durch das Aufliegen der Bakterien gewährleistete Kontakt eine hinreichende Bedingung für eine PDI ist, wofür bereits einige Indizien in der Literatur vorlagen.

Im Resultat hat sich gezeigt, dass die beiden hier verwendeten PS mittels e-Strahl-Funktionalisierung immobilisiert werden können und sie dabei ihre

grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften (Absorption, Fluoreszenz und $^1\text{O}_2$ -Generierung) beibehalten. Allerdings ist die Immobilisierung des TMPyP noch unzureichend, wie Extraktionsversuche auf nassem FP und mit Bakteriensuspension belegen. Es konnte gezeigt werden, dass entgegen der anfänglichen Annahme die Seite der Bestrahlung bzw. die Dämpfung des e-Strahls beim Probendurchgang eine nicht zu vernachlässigende Rolle für die PS-Immobilisierung spielt. Daraus ergeben sich Konsequenzen für erste Optimierungsschritte der e-Strahl-Funktionalisierung. Erstens, muss eine verbesserte Nachbehandlung der Membranen durchgeführt werden, um schlecht gebundene PS-Moleküle herauszulösen. Vor allem beim TMPyP ist hier eine zusätzliche Extraktion mit EtOH notwendig. Zweitens, muss eine beidseitige Bestrahlung der Membranen erfolgen. Außerdem wären der Einfluss einer höheren Gesamtstrahlendosis und anderer Substratpolymere zu prüfen.

Beide Membranen zeichnen sich durch eine deutliche $^1\text{O}_2$ -Generierung aus. Beim Vergleich nass und trocken gescannter TMPyP- und TPPS-funktionalisierter Membranen kann für beide Membranen eine deutliche Veränderung der Lumineszenzkinetik mit kürzeren An- und Abklingzeiten nachvollzogen werden. Der generierte $^1\text{O}_2$ ist dazu in der Lage aus dem Membransubstrat hinauszudiffundieren, wo er seine biologische Wirkung entfalten kann. Im qualitativen PDI-Versuch unter zweitägiger Weißlichtbestrahlung sind sowohl die TMPyP- als auch die TPPS-funktionalisierten Membranen phototoxisch gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Das bestätigt zunächst die Annahme einer PDI-Wirkung des anionischen TPPS nach seiner Immobilisierung. Unter verschärften Bedingungen bei kürzeren Beleuchtungsdauern zeigt die quantitativ durchgeführte PDI gegen *E. coli* jedoch eine um mehr als vier Log_{10} -Stufen höhere Phototoxizität der TMPyP-funktionalisierten Membranen. Gleichzeitig offenbaren fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen eine mit der Inkubationsdauer fortschreitende Extraktion des TMPyP durch die Bakterien. Für die TPPS-Membranen ist das nicht der Fall. Auf dieser Basis ist eine abschließende Bewertung der damit scheinbar deutlich effizienteren PDI-Aktivität der TMPyP- im Vergleich zu den TPPS-Membranen nicht möglich. Folglich kann zunächst nur für die TPPS-funktionalisierten Membranen von PDI-aktiven Polymeren auf Basis eines fest immobilisierten PS gesprochen werden, da nur hier eine PS-Extraktion durch Bakterien ausgeschlossen werden kann. Erste Untersuchungen zur Photostabilität zeigen, dass aber gerade das TPPS

unter PDI-relevanten Bedingungen innerhalb einiger Stunden ausbleicht. Für Langzeitanwendungen kommt es also nicht infrage. Somit wäre prinzipiell eine Verwendung von TMPyP nach optimierter Funktionalisierungsprozedur dem TPPS vorzuziehen.

Zusammenfassend demonstrieren die photophysikalischen Ergebnisse, insbesondere der $^1\text{O}_2$ -Nachweis, und die phototoxischen Untersuchungen, dass die e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung von kommerziellen Filtermembranen mit PS möglich und erfolgversprechend ist. Gerade die Beobachtung, dass auch in Suspension schlecht wirksame PS nach ihrer Immobilisierung als phototoxisch einzustufen sind, erweitern das Spektrum nutzbarer PS. Somit könnten Anforderungen wie Bindungsstabilität im Substrat und Photostabilität weiter in den Vordergrund rücken. Das ist besonders für die Filtrationstechnologie von Bedeutung, da eine tatsächliche Minimierung von Fouling nur durch eine stetige PDI, d. h. unter Dauerbeleuchtung mit Weißlicht, möglich ist. Bei der e-Strahl-Funktionalisierung handelt es sich um ein allgemeines Oberflächenveredelungsverfahren. Daher ist eine Übertragung auf andere Substrate, z. B. Filmbeschichtungen oder Textilien, denkbar.

Für die **textiltechnologische Funktionalisierung von Polyestergeweben** wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet – die Färbung im Imprägnierverfahren mit Bindersystem (Probe I1nb) und die Färbung im Ausziehverfahren bei verfahrensüblicher Temperatur (130 °C, Probe A1nb) und verminderter Temperatur (98 °C, Probe A2nb) – und mit drei kovalenten Ansätzen verglichen (Proben K1 bis K3). Die Färbung erfolgte mit kommerziellem TMPyP (textiltechnologische Färbung) oder einem einfach substituierten und ebenfalls kommerziellen jedoch deutlich teureren TMPyP-Derivat (kovalente Färbung).

Alle Funktionalisierungsansätze führen zu einer gut sichtbaren Einfärbung der Textilsubstrate. Nur die Proben I1nb und K3 weisen noch ein schwaches Bluten des PS auf. Die Nachbehandlung der textiltechnologisch funktionalisierten Proben führt zu einer deutlichen Steigerung der Waschechtheit. Die grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften, insbesondere die Möglichkeit zur $^1\text{O}_2$ -Generierung, bleiben erhalten und korrelieren innerhalb der Messunsicherheiten mit der Einfärbung der Substrate bzw. den Funktionalisierungsparametern. Mit Ausnahme des für sich zu betrachtenden Imprägnierverfahrens im Bindersystem führen höhere Temperaturen (130 °C oder 100 °C bzw.

98 °C) und/oder ein größerer aktivierter Faserquerschnitt (alkalisiertes oder kationisch anfärbbares PET-Substrat) auch zu einer intensiveren Färbung. Auf Basis dieser Ergebnisse wären also zunächst auch die extremeren Färbeparameter vorzuziehen. Erst die Messung der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik und die Gegenüberstellung nass und trocken gescannter Proben offenbaren deutliche Unterschiede in der anzunehmenden PS-Lokalisierung und damit zu erwartenden PDI-Aktivität der Proben. Durch die Färbung bei höheren Temperaturen schmilzt der PS tiefer in die Fasern ein und es kann nicht mehr genügend $^1\text{O}_2$ aus den Fasern hinausdiffundieren. Dieser Effekt wird sowohl für die kovalent funktionalisierten Proben K1 und K3 als auch die im Ausziehverfahren gefärbten Proben A1nb und A2nb beobachtet. Hier wird der Vorteil des Imprägnierverfahrens deutlich. Durch die Verwendung des Bindersystems ist das TMPyP in einem dünnen Film auf der unmittelbaren Faseroberfläche immobilisiert. Diese Probe reagiert in den zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzmessungen auch mit Abstand am stärksten auf eine veränderte Mikroumgebung. In PDI-Versuchen werden diese Beobachtungen bestätigt. Mit Ausnahme der Probe K2, die aus alkalisch vorbehandeltem Substrat besteht und eine phototoxische Wirkung gegen den *M. luteus* zeigt, sind die kovalent funktionalisierten Proben nur geringfügig bis gar nicht phototoxisch. Die Probe A2nb ist im Gegensatz zur Probe A1nb trotz einer deutlich geringeren Einfärbung phototoxisch und in der Lage innerhalb von einer Stunde Weißlichtbestrahlung ca. drei Log_{10} -Stufen des gramnegativen *E. coli* zu inaktivieren. Die stärkste phototoxische Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien zeigt die im Bindersystem gefärbte Probe I1nb. Bereits nach 30-minütiger Weißlichtbestrahlung sind alle zählbaren Bakterien inaktiviert und die Phototoxizität beträgt mindestens fünf Log_{10} -Stufen gegen den *E. coli*. Die wegen der sehr guten PDI-Eigenschaften analog zu den mit TMPyP funktionalisierten Mikrofiltrationsmembranen durchgeführten Extraktionsversuche mit *E. coli* können ein leichtes Bluten der Proben I1nr nicht ausschließen. Jedoch scheint dieses vernachlässigbar und ist im Gegensatz zu der an TMPyP-dotierten Mikrofiltrationsmembranen festgestellten PS-Extraktion auf einen konstanten Bruchteil von Bakterienzellen beschränkt. Schließlich zeigt die Probe I1nb eine gute Photostabilität des TMPyP. Nach 15 Tagen beträgt die Zellinaktivierung des *E. coli* immer noch mindestens zwei Log_{10} -Stufen. Zusammenfassend ist der tex-

tiltechnologische Ansatz – sowohl im Imprägnier- als auch im Ausziehverfahren – als ein sehr vielversprechendes Verfahren zur antimikrobiellen Ausrüstung von Textilien einzustufen. Dabei sind beide Methoden sowohl in ihrer PDI-Wirkung als auch in ihrer industriellen Umsetzbarkeit den hier untersuchten kovalenten Verfahren deutlich überlegen.

Im Ausblick ist bei beiden textiltechnologischen Verfahren eine Übertragung auf Baumwollgewebe bzw. Polyester-Baumwoll-Mischgewebe denkbar und für die Verwendung im klinischen Bereich sinnvoll. Dabei bestünde durch eine alkalische Aktivierung der OH-Gruppen der Zellulose eine Möglichkeit die Bindungsaffinität der Faseroberflächen zum TMPyP zu erhöhen. Außerdem ist eine Verbesserung der Waschechtheit der im Imprägnierverfahren gefärbten Probe durchzuführen. Dabei sollte evaluiert werden, inwiefern eine mehrstufige Imprägnierung zur Erhöhung der Menge des immobilisierten TMPyP und der Photostabilität beitragen kann. Die Folgeschritte bestünden in einer Prüfung der nutzungsrelevanten Textileigenschaften, wie u.a. Reißfestigkeit, Waschechtheit, Schweißechtheit, Hautverträglichkeit und Nahtschiebefestigkeit. Diese Prüfungen sollten sowohl an beleuchteten Textilien als auch an Dunkelkontrollen durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss der $^1\text{O}_2$ -Generierung zu identifizieren. Die Möglichkeit einer Skalierung der textiltechnologischen Methoden war von Anfang an gegeben und benötigt lediglich eine Anpassung der Laufgeschwindigkeit der Textilbahnen und der Luftfeuchtigkeit. Eine Umsetzung des Imprägnierverfahrens im Technikumsmaßstab wurde bereits durchgeführt und für die PDI validiert. Damit ist bereits zu diesem Zeitpunkt eine kommerzielle Umsetzung des Verfahrens denkbar.

Im Rahmen der hier durchgeführten PDI-Experimente wurden zunächst ausschließlich der gramnegative Modellkeim *E. coli* und grampositive Luftkeim *M. luteus* behandelt. Für eine bessere Bewertung der breiten Einsatzfähigkeit als antimikrobielle Oberflächen sind weitere Versuche mit anderen Bakterien und Mikroorganismen geboten. Erste Handversuche mit Mikrofiltrationsmembranen und im Imprägnierverfahren gefärbten Textilgeweben konnten bereits eine PDI-Wirksamkeit gegen den Wasserkeim *P. fluorescens*, den Hefepilz *Candida albicans* und das Myzel des Schimmelpilzes *Cladosporium cladosporioides* aufzeigen. Diese Versuche sollten ausgeweitet und zusätzlich eine Inaktivierung von Pilzsporen geprüft werden. Außerdem sollte die prinzipielle Übertragbarkeit der e-Strahl-Funktionalisierung und textiltechnologischen

Färbung auf andere PS validiert werden. Damit bestünde das Potenzial PS mit verbesserten Eigenschaften, wie z. B. einer höheren Lichtstabilität oder effizienteren Immobilisierung, zu verwenden. Die hier durchgeführten Versuche erfolgten unter Extrembedingungen mit sehr hohen Keimbelastungen von ca. 1×10^8 KBE/ml in den Bakteriensuspensionen bzw. über 1×10^6 KBE/cm² auf den funktionalisierten Oberflächen. Im Gegensatz dazu beträgt die geschätzte Keimbelastung jeweils weniger als 1×10^5 KBE/cm² auf Wundverbänden, 1×10^2 KBE/cm² auf Krankenhausoberflächen in Patientennähe und 1×10^5 KBE/ml in Abwasser [313, 62]. Im nächsten Schritt hin zu einer kommerziellen Anwendung sollte die PDI daher bei geringeren Bakteriendichten und kürzeren bzw. milderen Bestrahlungen untersucht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein systematisierter methodischer Ansatz zur Evaluierung PDI-aktiver Oberflächen mit fest immobilisierten PS vorgestellt. Dieser beinhaltet drei aufeinander aufbauende Hauptsegmente (PS-Dotierung, ¹O₂-Generierung, Phototoxizität) und drei untergeordnete Zusatzsegmente (PS-Bindungsstabilität, Substratdegradation, PS-Photostabilität). Im Verlauf der Arbeit hat sich gezeigt, dass die ¹O₂-Generierung und insbesondere die Einbeziehung der Lumineszenzkinetik bei veränderter Mikroumgebung eine essentielle Brücke zwischen der Funktionalisierung und der Phototoxizität darstellt. Erst die Untersuchung der Lumineszenzkinetik erlaubt eine Bewertung der PDI-Aktivität und liefert den Beweis für eine mögliche biologische Wirksamkeit des generierten ¹O₂. Eine PDI-Abschätzung rein auf Basis der ¹O₂-Signalintensität ist irreführend, da unterschiedliche Mikroumgebungen auch unterschiedliche strahlende Ratenkonstanten aufweisen können, wie es z. B. in Polymeren der Fall ist. Das kann eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zur Folge haben. Wichtigste Beispiele sind hierbei die Proben K1 und A1nb der funktionalisierten PET-Textilien. Beide Proben zeigen in ihrer jeweiligen Gruppe (textiltechnologische oder kovalente Funktionalisierung) die mit Abstand intensivsten ¹O₂-Signale, jedoch keine phototoxische Wirkung. Erst der Nachweis, dass bei nass inkubierten Proben auch eine deutliche Änderung der ¹O₂-Kinetik beobachtet werden kann, liefert Anhaltspunkte für eine tatsächliche PDI-Aktivität der Proben. Somit wurde hier erstmalig gezeigt, dass eine Prognose für die PDI-Aktivität PS-funktionalisierter Polymere möglich ist. Das Resultat war schließlich die auf Basis der Messungen zur ¹O₂-Kinetik der Probe

A1nb nachträglich durchgeführte Funktionalisierung der Probe A2nb bei verminderter Prozesstemperatur. Die nachweisliche PDI-Aktivität dieser Probe im Gegensatz zur Probe A1nb demonstriert das Potenzial der Messungen der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik bei veränderter Mikroumgebung. Abseits der in dieser Arbeit dargestellten Proben konnten diese Zusammenhänge an mehr als 50 unterschiedlich funktionalisierten Textilien und Mikrofiltrationsmembranen bestätigt werden [314, 315]. Ohne nachweisbare $^1\text{O}_2$ -Kinetikänderung im Vergleich nass und trocken durchgeführter $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzscans konnte auch keine PDI-Aktivität beobachtet werden – und zwar unabhängig von der PS-Dotierung oder $^1\text{O}_2$ -Signalintensität. Zum jetzigen Zeitpunkt bildet diese hier erstmalig vorgestellte Methode einen nur sehr groben und rein qualitativen Ansatz. Ausblickend sollten parametrische Signalanpassungen in Kombination mit PS-Konzentrations- und Prozesstemperaturreihen durchgeführt werden. Damit bestünde die Möglichkeit einer quantitativen Korrelation von $^1\text{O}_2$ -Lumineszenzkinetik und Phototoxizität mit deren Hilfe Schwellwerte für die PDI-Anforderung der funktionalisierten Materialien definiert werden könnten. Außerdem sollte die Möglichkeit eines indirekten $^1\text{O}_2$ -Nachweises auf funktionalisierten Oberflächen evaluiert und den zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ -Messungen gegenübergestellt werden. Dabei ist prinzipiell zu beachten, dass die Verwendung von Monitormolekülen i. d. R. systemverfremdend und nicht-quantitativ ist. Sie bieten jedoch den Vorteil einer geringeren technischen Schwelle für den Anwender. Zusammenfassend bildet der hier vorgestellte Ansatz die erstmalige Möglichkeit einer universellen und direkten Methode PDI-aktive Oberflächen unabhängig von zeit- und kostenaufwendigen, aber doch nur sehr spezifischen, mikrobiologischen Versuchen unter *in situ* Bedingungen vorab zu bewerten. Da die Messung der $^1\text{O}_2$ -Kinetik orts aufgelöst durchgeführt werden kann, bietet sie die Möglichkeit einer flächendeckenden Qualitätskontrolle funktionalisierter Oberflächen.

Eine weiteres essentielles Ergebnis der vorliegenden Arbeit bildet der Nachweis der PS-Extraktion unter PDI-relevanten Bedingungen. Besonders im Fall der mit TMPyP-funktionalisierten Membranen ließ die fortschreitende PS-Extraktion durch *E. coli* auf eine potentielle Überbewertung der PDI-Aktivität dieser Oberflächen schließen. Es hat sich gezeigt, dass selbst bei definierten Kopplungsmechanismen ein Bluten des PS, wie es im Fall der kovalent funktionalisierten K3-Textilproben auf nassem Filterpapier beobachtet wurde, nicht

ausgeschlossen werden kann. Damit sollten alle funktionalisierten Materialien auch unter anwendungsbezogenen Bedingungen, und im Speziellen PDI-relevanten Bedingungen, geprüft werden. Das erscheint trivial, wurde jedoch in bisherigen Publikationen weitestgehend ignoriert. Von den knapp 80 gesichteten Fachpublikationen zu PDI-aktiven Oberflächen wird nur in einem Fall ein Extraktionsversuch mit Bakterien durchgeführt [102]. Lediglich in drei weiteren Publikationen, darunter die im Zuge dieser Arbeit veröffentlichte Publikation zu Mikrofiltrationsmembranen, wird eine Extraktion im als Bakterienmedium verwendeten PBS durchgeführt [316, 111, 282]. Teilweise gut sichtbare Hemmhöfe an funktionalisierten Oberflächen belegen, dass die hier festgestellte PS-Extraktion während der PDI keine Ausnahme ist [317, 318]. Folglich sollte die Bedeutung von Untersuchungen zur PS-Bindungsstabilität unter PDI-Bedingungen, d. h. Extraktionsversuchen mit Bakterien, zukünftig hervorgehoben werden. Erst wenn diese Stabilität gewährleistet ist, kann auch von PDI-aktiven Oberflächen auf Basis eines stationär vermittelten photodynamischen Effektes gesprochen werden. Damit sollten Extraktionsversuche unter PDI-relevanten Bedingung nicht nur als ergänzende, sondern als notwendige Versuche betrachtet werden. Eine gut geeignete Methode bildet die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Proben am CLSM. Wichtige Indizien für eine potentielle PS-Extraktion durch Mikroorganismen können aber bereits Absorptionsmessungen mit Bakteriensuspension und vor allem Extraktionsversuche auf FP, das in seiner Struktur grob einer Zellwand ähnelt, liefern.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die e-Strahl-vermittelte Funktionalisierung von Mikrofiltrationsmembranen als auch eine textiltechnologische Funktionalisierung von Textilgeweben valide und aussichtsreiche Methoden für eine nachträgliche antimikrobielle Ausrüstung kommerzieller Substrate darstellen. Im Rahmen der Promotion konnte eine Methodik ausgearbeitet werden, die erstmalig den $^1\text{O}_2$ und seinen orts- und zeitaufgelösten Nachweis systematisch für die angesprochene Fragestellung nutzt.

Literaturverzeichnis

- [1] RICE, L.: Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. In: *Journal of Infectious Diseases* (197), 2008, 1079–1081.
- [2] ARIAS, C.; MURRAY, B.: Antibiotic-resistant bugs in the 21st century – a clinical super-challenge. In: *New England Journal of Medicine* (360), 2009, 439–443.
- [3] World Health Organization (WHO): Antimicrobial Resistance – Global Report on Surveillance, *World Health Organization*, 2014.
- [4] World Health Organization (WHO): Health in 2015 – From MDGS, millennium development goals, to SDGS, sustainable development goals, *World Health Organization*, 2015.
- [5] World Health Organization (WHO): World Health Statistics 2016 – Monitoring Health for the Sustainable Development Goals (SDGs), *World Health Organization*, 2016.
- [6] World Health Assembly (WHA): Sixty-eighth World Health Assembly, *World Health Organization*, 18.-26. Mai 2015.
- [7] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Annual Epidemiological Report 2013 – Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data, *ECDC*, Stockholm, 2013.
- [8] O'NEILL, J.: Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. In: *Review on Antimicrobial Resistance* (), 2014.
- [9] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015 – Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), *ECDC*, Stockholm, 2017.
- [10] GRAFFUNDER, E.; VENEZIA, R.: Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* (49), 2002, 999–1005.
- [11] Verordnung zur Anpassung der Meldepflichten nach dem Infektionsschutzgesetz an die epidemische Lage (IfSG-Meldepflicht-Anpassungsverordnung - IfSGMeldAnpV) § 2 Anpassung der Meldepflicht in Bezug auf namentlich meldepflichtige Nachweise von Krankheitserregern, *Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz*, 01. Mai 2016.

- [12] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Antimicrobial resistance (EARS-Net) – Annual Epidemiological Report for 2014, *ECDC*, Stockholm, 2018.
- [13] Robert Koch Institut (RKI): Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland - Update 2011/2012. In: *Epidemiologisches Bulletin* (21), 2013.
- [14] EXNER, M.; SCHMITHAUSEN, R.; SCHREIBER, C., et al.: Zum Vorkommen und zur vorläufigen hygienisch-medizinischen Bewertung von Antibiotika-resistenten Bakterien mit humanmedizinischer Bedeutung in Gewässern, Abwässern, Badegewässern sowie zu möglichen Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. In: *Hygiene & Medizin* (43), 2018, D46–D54.
- [15] VIDAURRE, R.; LUKAT, E.; STEINHOFF-WAGNER, J., et al.: Konzepte zur Minderung von Arzneimittelinträgen aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung in die Umwelt, 2016.
- [16] Robert Koch Institut (RKI): Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger. In: *Epidemiologisches Bulletin* (28), 2018.
- [17] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014 – Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), *ECDC*, Stockholm, 2015.
- [18] RICHTER, M.; DROWN, B.; RILEY, A., et al.: Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. In: *Nature* (545), 2017, 299–304.
- [19] BROWN, D.; MAY-DRACKA, T.; GAGNON, M., et al.: Trends and exceptions of physical properties on antibacterial activity for Gram-positive and Gram-negative pathogens. In: *Journal of Medicinal Chemistry* (57), 2014, 10144–10161.
- [20] MARQUARDT, R.; LI, S.: Antimicrobial resistance in livestock: advances and alternatives to antibiotics. In: *Animal Frontiers* (8), 2018, 30–37.
- [21] WOOLHOUSE, M.; WARD, M.; VAN BUNNIK, B., et al.: Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* (370), 2015, 20140083.

- [22] World Health Organization (WHO): Part B. Appropriate antimicrobial use and emerging resistance: issues and interventions. In: *WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance*, World Health Organization, 2001.
- [23] Robert Koch Institut (RKI): Erhebung von Risikofaktoren einer Besiedlung/Infektion mit MRE im außer(akut)klinischen Bereich. In: *Epidemiologisches Bulletin* (7), 2018.
- [24] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 – Surveillance Report, ECDC, Stockholm, 2019.
- [25] MAISCH, T.; HACKBARTH, S.; REGENSBURGER, J., et al.: Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* (9), 2011, 360–366.
- [26] Antibiotikaresistenz. In: *Psyhyrembel - Klinisches Wörterbuch*, 267, De Gruyter, 2017.
- [27] LeCLERC, J.; LI, B.; PAYNE, W., et al.: High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. In: *Science* (274), 1996, 1208–1211.
- [28] BLAIR, J.; WEBBER, M.; BAYLAY, A., et al.: Molecular mechanisms of antibiotic resistance. In: *Nature Reviews Microbiology* (13), 2015, 42–51.
- [29] BASTARRACHEA, L.; DENIS-ROHR, A.; GODDARD, J.: Antimicrobial food equipment coatings: applications and challenges. In: *Annual review of food science and technology* (6), 2015, 97–118.
- [30] OTTER, J.; YEZLI, S.; FRENCH, G.: The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. In: *Infection control and hospital epidemiology* (32), 2011, 687–699.
- [31] KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G.: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. In: *BMC infectious diseases* (6), 2006, 130.
- [32] CLOUTIER, M.; MANTOVANI, D.; ROSEI, F.: Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. In: *Trends in biotechnology* (33), 2015, 637–652.
- [33] LEWIS, K.; KLIBANOV, A.: Surpassing nature: rational design of sterile-surface materials. In: *Trends in biotechnology* (23), 2005, 343–348.

- [34] GREEN, J.-B.; FULGHUM, T.; NORDHAUS, M.: Review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing. In: *Biointerphases* (6), 2011, 43.
- [35] WEBER, D.; RUTALA, W.: Self-disinfecting surfaces: review of current methodologies and future prospects. In: *American journal of infection control* (41), 2013, S31-S35.
- [36] Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus, *S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V.*, 2013.
- [37] O'NEILL, J.: Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final report and Recommendations. In: *Review on Antimicrobial Resistance* (), 2016.
- [38] ZIESING, S.; FILLE, M.: Resistenz. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [39] *Europäisches Parlament*, Plenartagung: Landwirtschaft und ländliche Entwicklung; Umweltfragen, öffentliche Gesundheit und Lebensmittelsicherheit: Bekämpfung der Ausbreitung der Antibiotikaresistenz von Tieren auf Menschen. *Pressemitteilung*, 25-10-2018.
- [40] FISCHER, J.; RODRÍGUEZ, I.; SCHMOGER, S., et al.: *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* (67), 2012, 1793–1795.
- [41] RÖDER, B.: Photodynamic Therapy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [42] POHL, J.; PREUß, A.; RÖDER, B.: Chapter 41. Photodynamic Inactivation of Microorganisms. In: *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences 2*, Royal Society of Chemistry, 2016.
- [43] FILLE, M.; ZIESING, S.: Antibakterielle Wirkung. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [44] HAMBLIN, M.; HASAN, T.: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (3), 2004, 436–450.
- [45] JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M., et al.: Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. In: *Lasers in Surgery and Medicine* (38), 2006, 468–481.

- [46] O'RIORDAN, K.; AKILOV, O.; HASAN, T.: The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. In: *Photodiagnosis and photodynamic therapy* (2), 2005, 247–262.
- [47] PREUß, A.; SALTSMAN, I.; MAHAMMED, A., et al.: Photodynamic inactivation of mold fungi spores by newly developed charged corroles. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (133), 2014, 39–46.
- [48] GONZALES, F.; DA SILVA, S.; ROBERTS, D., et al.: Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. In: *Photochemistry and photobiology* (86), 2010, 653–661.
- [49] WIEHE, A.; O'BRIEN, J.; SENGE, M.: Trends and targets in antiviral phototherapy. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (18), 2019.
- [50] GOMES, M.; WORANOVICZ-BARREIRA, S.; FAUSTINO, M., et al.: Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (10), 2011, 1735–1743.
- [51] DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M.: Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. In: *Photodiagnosis and photodynamic therapy* (6), 2009, 170–188.
- [52] ALVES, E.; FAUSTINO, M.; NEVES, M., et al.: An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. In: *Future medicinal chemistry* (6), 2014, 141–164.
- [53] KÖMERIK, N.; WILSON, M.; POOLE, S.: The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria. In: *Photochemistry and photobiology* (72), 2000, 676–680.
- [54] TUBBY, S.; WILSON, M.; NAIR, S.: Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent. In: *BMC Microbiology* (9), 2009, 211.
- [55] CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W., et al.: Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. In: *Critical reviews in microbiology* (44), 2018, 571–589.
- [56] WAINWRIGHT, M.; MAISCH, T.; NONELL, S., et al.: Photoantimicrobials—are we afraid of the light? In: *The Lancet infectious diseases* (17), 2017, e49–e55.

- [57] WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K.: Photosensitising agents - circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. In: *International Biodegradation & Biodegradation* (53), 2004, 119–126.
- [58] ALMEIDA, J.; TOMÉ, J.; Neves, M. G. P. M. S., et al.: Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (13), 2014, 626–633.
- [59] CARVALHO, C.; GOMES, A.; FERNANDES, S., et al.: Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: bacterial β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (88), 2007, 112–118.
- [60] ACHER, A.; FISCHER, E.; TURNHEIM, R., et al.: Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. In: *Water Research* (31), 1997, 1398–1404.
- [61] PIBIRI, I.; BUSCEMI, S.; PALUMBO PICCIONELLO, A., et al.: Photochemically Produced Singlet Oxygen: Applications and Perspectives. In: *ChemPhotoChem* (36), 2018, 385.
- [62] ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; GOMES, N., et al.: Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. In: *Marine Drugs* (7), 2009, 268–313.
- [63] ATIYEH, B.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S., et al.: Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. In: *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries* (33), 2007, 139–148.
- [64] MAISCH, T.: Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (14), 2015, 1518–1526.
- [65] TAVARES, A.; CARVALHO, C.; FAUSTINO, M., et al.: Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. In: *Marine Drugs* (8), 2010, 91–105.
- [66] KASHEF, N.; HAMBLIN, M.: Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? In: *Drug Resistance Updates* (31), 2017, 31–42.

- [67] MC CAY, P.; OCAMPO-SOSA, A.; FLEMING, G.: Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. In: *Microbiology* (156), 2010, 30–38.
- [68] BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M.; STEPANAUSKAS, R., et al.: Co-selection of antibiotic and metal resistance. In: *Trends in microbiology* (14), 2006, 176–182.
- [69] WILLINGHAN, E.; SANDER, J.; THAYER, S., et al.: Investigation of Bacterial Resistance to Hatchery Disinfectants. In: *Avian Diseases* (40), 1996, 510.
- [70] PAGE, K.; WILSON, M.; PARKIN, I.: Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. In: *Journal of materials chemistry* (19), 2009, 3819–3831.
- [71] CRAIG, R.; MCCOY, C.; GORMAN, S., et al.: Photosensitisers – the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces. In: *Expert opinion on drug delivery* (12), 2015, 85–101.
- [72] SPAGNUL, C.; TURNER, L.; BOYLE, R.: Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (150), 2015, 11–30.
- [73] MEYER-BETZ, F.: Untersuchung über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. In: *Deutsches Archiv für klinische Medizin* (112), 1913.
- [74] TREHAN, M.; TAYLOR, C.: Chapter 21: Cutaneous photosensitivity and photoprotection for photodynamic therapy patients. In: *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology 2*.
- [75] FRANCK, B.; DUST, M.; STANGE, A., et al.: Über die Rolle von Singulett-Sauerstoff bei Porphyrin-Erkrankungen. In: *Naturwissenschaften* (69), 1982, 401–402.
- [76] GLAESER, S.; GROSSART, H.-P.; GLAESER, J.: Singlet oxygen, a neglected but important environmental factor: short-term and long-term effects on bacterioplankton composition in a humic lake. In: *Environmental microbiology* (12), 2010, 3124–3136.

- [77] MOSTAFA, S.; ROSARIO-ORTIZ, F.: Singlet oxygen formation from wastewater organic matter. In: *Environmental science & technology* (47), 2013, 8179–8186.
- [78] RAAB, O.: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. In: *Zeitschrift für Biologie* (39), 1900, 524–546.
- [79] TAPPEINER, H.: Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien. In: *Deutsches Archiv für klinische Medizin* (80), 1904, 427–487.
- [80] TAPPEINER, H.; JODBLAUER, A.: Zur Kenntnis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) Stoffe. In: *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (1), 1904, 579–580.
- [81] FERNANDES, P.: Antibacterial discovery and development – the failure of success? In: *Nature biotechnology* (24), 2006, 1497–1503.
- [82] FLEMING, A.: Penicillin – Nobel Lecture, 11.12.1945.
- [83] MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y.: Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (14), 1992, 262–266.
- [84] NITZAN, Y.; DROR, R.; LADAN, H., et al.: Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. In: *Photochemistry and photobiology* (62), 1995, 342–347.
- [85] MINNOCK, A.; VERNON, D.; SCHOFIELD, J., et al.: Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (32), 1996, 159–164.
- [86] MERCHAT, M.; SPIKES, J.; BERTOLONI, G., et al.: Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (35), 1996, 149–157.
- [87] MERCHAT, M.; BERTOLINI, G.; GIACOMINI, P., et al.: Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (32), 1996, 153–157.
- [88] PARKER, S.: The use of diffuse laser photonic energy and indocyanine green photosensitizer as an adjunct to periodontal therapy. In: *British dental journal* (215), 2013, 167–171.

- [89] MIELCZAREK-BADORA, E.; SZULC, M.: Photodynamic Therapy and its Role in Periodontitis Treatment. In: *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (67), 2013, 1058–1065.
- [90] POLANSKY, R.; HAAS, M.; HESCHL, A., et al.: Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. In: *Journal of clinical periodontology* (36), 2009, 575–580.
- [91] STANLEY, S.; SCHOLLE, F.; ZHU, J., et al.: Photosensitizer-Embedded Polyacrylonitrile Nanofibers as Antimicrobial Non-Woven Textile. In: *Nanomaterials* (6), 2016, 77.
- [92] NAKONECHNY, F.; PINKUS, A.; HAI, S., et al.: Eradication of Gram-positive and Gram-negative bacteria by photosensitizers immobilized in polystyrene. In: *Photochemistry and photobiology* (89), 2013, 671–678.
- [93] CAMARGO, C.; Martins, Virginia da Conceição Amaro; de Guzzi Plepis, Ana Maria, et al.: Photoinactivation of Gram-Negative Bacteria in Circulating Water Using Chitosan Membranes Containing Porphyrin. In: *Biological and Chemical Research* (1), 2014.
- [94] HENKE, P.; KOZAK, H.; ARTEMENKO, A., et al.: Superhydrophilic polystyrene nanofiber materials generating $O_2(^1\Delta_g)$: postprocessing surface modifications toward efficient antibacterial effect. In: *ACS applied materials & interfaces* (6), 2014, 13007–13014.
- [95] NAIK, A.; ISMAIL, S.; KAY, C., et al.: Antimicrobial activity of polyurethane embedded with methylene blue, toluidene blue and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*; illuminated with white light. In: *Materials Chemistry and Physics* (129), 2011, 446–450.
- [96] DECRAENE, V.; PRATTEN, J.; WILSON, M.: Novel light-activated antimicrobial coatings are effective against surface-deposited *Staphylococcus aureus*. In: *Current microbiology* (57), 2008, 269–273.
- [97] PERNI, S.; PROKOPOVICH, P.; PICCIRILLO, C., et al.: Toluidine blue-containing polymers exhibit potent bactericidal activity when irradiated with red laser light. In: *Journal of materials chemistry* (19), 2009, 2715.
- [98] MCCOY, C.; O'NEIL, E.; COWLEY, J., et al.: Photodynamic antimicrobial polymers for infection control. In: *PloS one* (9), 2014, e108500.
- [99] MOSINGER, J.; JIRSÁK, O.; KUBÁT, P., et al.: Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen. In: *Journal of materials chemistry* (17), 2007, 164–166.

- [100] BONNETT, R.; EVANS, R.; GALIA, A.: Immobilized photosensitizers: photosensitizer films with microbicidal effects. In: *BiOS Europe '97*.
- [101] BONNETT, R.; KRYSTEVA, M.; LALOV, I., et al.: Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. In: *Water Research* (40), 2006, 1269–1275.
- [102] WANG, Q.; CHEN, W.; ZHANG, Q., et al.: Preparation of photodynamic P(MMA-co-MAA) composite nanofibers doped with MMT: A facile method for increasing antimicrobial efficiency. In: *Applied Surface Science* (457), 2018, 247–255.
- [103] GOETHALS, A.; MUGADZA, T.; ARSLANOGLU, Y., et al.: Polyamide nanofiber membranes functionalized with zinc phthalocyanines. In: *Journal of Applied Polymer Science* (131), 2014, 1-7.
- [104] MANJÓN, F.; SANTANA-MAGAÑA, M.; GARCÍA-FRESNADILLO, D., et al.: Are silicone-supported C60-fullerenes an alternative to Ru(II) polypyridyls for photodynamic solar water disinfection? In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (13), 2014, 397–406.
- [105] VILLÉN, L.; MANJÓN, F.; GARCÍA-FRESNADILLO, D., et al.: Solar water disinfection by photocatalytic singlet oxygen production in heterogeneous medium. In: *Applied Catalysis B: Environmental* (69), 2006, 1–9.
- [106] SUCHÁNEK, J.; HENKE, P.; MOSINGER, J., et al.: Effect of temperature on photophysical properties of polymeric nanofiber materials with porphyrin photosensitizers. In: *The Journal of Physical Chemistry B* (118), 2014, 6167–6174.
- [107] HENKE, P.; LANG, K.; KUBÁT, P., et al.: Polystyrene nanofiber materials modified with an externally bound porphyrin photosensitizer. In: *ACS applied materials & interfaces* (5), 2013, 3776–3783.
- [108] MANJÓN, F.; GARCÍA-FRESNADILLO, D.; ORELLANA, G.: Water disinfection with Ru(II) photosensitisers supported on ionic porous silicones. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (8), 2009, 926–932.
- [109] MANJÓN, F.; SANTANA-MAGAÑA, M.; GARCÍA-FRESNADILLO, D., et al.: Singlet oxygen sensitizing materials based on porous silicone: photochemical characterization, effect of dye reloading and application to water disinfection with solar reactors. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (9), 2010, 838–845.

- [110] TEMPESTI, T.; ALVAREZ, M.; GÓMEZ, C., et al.: Poly(propylene)-based Films Modified with a Tetracationic Phthalocyanine with Applications in Photodynamic Inactivation of *Candida albicans*. In: *Polymer-Plastics Technology and Engineering* (57), 2018, 166–174.
- [111] GEORGE, L.; HILTUNEN, A.; SANTALA, V., et al.: Photo-antimicrobial efficacy of zinc complexes of porphyrin and phthalocyanine activated by inexpensive consumer LED lamp. In: *Journal of inorganic biochemistry* (183), 2018, 94–100.
- [112] CHEN, W.; WANG, W.; GE, X., et al.: Photooxidation Properties of Photosensitizer/Direct Dye Patterned Polyester/Cotton Fabrics. In: *Fibers and Polymers* (19), 2018, 1687–1693.
- [113] RINGOT, C.; SOL, V.; GRANET, R., et al.: Porphyrin-grafted cellulose fabric. In: *Materials Letters* (63), 2009, 1889–1891.
- [114] RINGOT, C.; SAAD, N.; GRANET, R., et al.: Meso-functionalized aminoporphyrins as efficient agents for photo-antibacterial surfaces. In: *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* (14), 2010, 925–931.
- [115] RINGOT, C.; SOL, V.; BARRIÈRE, M., et al.: Triazinyl porphyrin-based photo-active cotton fabrics: preparation, characterization, and antibacterial activity. In: *Biomacromolecules* (12), 2011, 1716–1723.
- [116] CHEN, J.; WANG, W.; HU, P., et al.: Dual antimicrobial actions on modified fabric leads to inactivation of drug-resistant bacteria. In: *Dyes and Pigments* (140), 2017, 236–243.
- [117] DONG, J.; GHILADI, R.; WANG, Q., et al.: Protoporphyrin IX conjugated bacterial cellulose via diamide spacer arms with specific antibacterial photodynamic inactivation against *Escherichia coli*. In: *Cellulose* (25), 2018, 1673–1686.
- [118] DONG, J.; GHILADI, R.; WANG, Q., et al.: Protoporphyrin-IX conjugated cellulose nanofibers that exhibit high antibacterial photodynamic inactivation efficacy. In: *Nanotechnology* (29), 2018, 265601.
- [119] KROUT, M.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.: Photobactericidal plastic films based on cellulose esterified by chloroacetate and a cationic porphyrin. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (16), 2008, 10091–10097.
- [120] MBAKIDI, J.-P.; HERKE, K.; ALVÈS, S., et al.: Synthesis and photobiocidal properties of cationic porphyrin-grafted paper. In: *Carbohydrate polymers* (91), 2013, 333–338.

- [121] BOUFI, S.; REI VILAR, M.; PARRA, V., et al.: Grafting of porphyrins on cellulose nanometric films. In: *Langmuir* (24), 2008, 7309–7315.
- [122] BOZJA, J.; SHERRILL, J.; MICHELSEN, S., et al.: Porphyrin-based, light-activated antimicrobial materials. In: *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* (41), 2003, 2297–2303.
- [123] MEMMI, A.; GRANET, R.; AOUNI, M., et al.: Synthesis of new photobactericidal polymers by “click chemistry” and a study of their biological activity. In: *e-Polymers* (12), 2012.
- [124] NZAMBE TA KEKI, J.; OUK, T.-S.; ZERROUKI, R., et al.: Synthesis and photobactericidal properties of a neutral porphyrin grafted onto lignocellulosic fibers. In: *Materials Science and Engineering: C* (62), 2016, 61–67.
- [125] MESQUITA, M.; MENEZES, J.; PIRES, S., et al.: Pyrrolidine-fused chlorin photosensitizer immobilized on solid supports for the photoinactivation of Gram negative bacteria. In: *Dyes and Pigments* (110), 2014, 123–133.
- [126] CARPENTER, B.; FEESE, E.; SADEGHIFAR, H., et al.: Porphyrin-cellulose nanocrystals: a photobactericidal material that exhibits broad spectrum antimicrobial activity. In: *Photochemistry and photobiology* (88), 2012, 527–536.
- [127] CARPENTER, B.; SCHOLLE, F.; SADEGHIFAR, H., et al.: Synthesis, characterization, and antimicrobial efficacy of photomicrobicidal cellulose paper. In: *Biomacromolecules* (16), 2015, 2482–2492.
- [128] BENSASSON, R.; LAND, E.; TRUSCOTT, T.: Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine, *Oxford University Press Inc., New York*, 1993.
- [129] ELSTNER, E.: Der Sauerstoff – Biochemie, Biologie, Medizin, *BI-Wissenschaftsverlag*, 1990.
- [130] YOUNG, R.; BREWER, D.; KAYSER, R., et al.: On the Mechanism of Quenching by Amines: A New Method for Investigation of Interactions with Triplet States. In: *Canadian Journal of Chemistry* (52), 1974, 2889–2893.
- [131] PERSANO, L.; CAMPOSEO, A.; TEKMEK, C., et al.: Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. In: *Macromolecular Materials and Engineering* (298), 2013, 504–520.
- [132] NONELL, S.; FLORS, C.: Chapter 25. Steady-State and Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Detection in the Near-IR. In: *Singlet Oxygen 2, Royal Society of Chemistry*, 2016.

- [133] SCHLOTHAUER, J.; FALCKENHAYN, J.; PERNA, T., et al.: Luminescence investigation of photosensitizer distribution in skin: correlation of singlet oxygen kinetics with the microarchitecture of the epidermis. In: *Journal of Biomedical Optics* (18), 2013, 115001.
- [134] SCHLOTHAUER, J.; PFITZNER, M.; RÖDER, B.: Chapter 27. Spatially Resolved Singlet Oxygen Detection and Imaging. In: *Singlet Oxygen 2, Royal Society of Chemistry*, 2016.
- [135] BORNHÜTTER, T.; POHL, J.; FISCHER, C., et al.: Development of Singlet Oxygen Luminescence Kinetics during the Photodynamic Inactivation of Green Algae. In: *Molecules* (21), 2016, 485.
- [136] BORNHÜTTER, T.; SHAMALI, N.; SALTSMAN, I., et al.: Singlet oxygen luminescence kinetics under PDI relevant conditions of pathogenic dermatophytes and molds. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (178), 2018, 606–613.
- [137] SCHMITZ, S.: Kap. 6: Steriltechnik und Subkultur. In: *Der Experimentator: Zellkultur, Spektrum Akademischer Verlag*, 2011.
- [138] MUKHERJEE, M.; DE, S.: Antibacterial polymeric membranes: a short review. In: *Environmental Science: Water Research & Technology* (4), 2018, 1078–1104.
- [139] PENDERGAST, M.; HOEK, E.: A review of water treatment membrane nanotechnologies. In: *Energy & Environmental Science* (4), 2011, 1946–1971.
- [140] SOBSEY, M.; STAUBER, C.; CASANOVA, L., et al.: Point of use household drinking water filtration: A practical, effective solution for providing sustained access to safe drinking water in the developing world. In: *Environmental science & technology* (42), 2008, 4261–4267.
- [141] LE-CLECH, P.; CHEN, V.; FANE, T.: Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. In: *Journal of Membrane Science* (284), 2006, 17–53.
- [142] KNOELL, T.: Biofouling potentials of microporous polysulfone membranes containing a sulfonated polyether-ethersulfone/polyethersulfone block copolymer: correlation of membrane surface properties with bacterial attachment. In: *Journal of Membrane Science* (157), 1999, 117–138.

- [143] DREWS, A.: Membrane fouling in membrane bioreactors – Characterisation, contradictions, cause and cures. In: *Journal of Membrane Science* (363), 2010, 1–28.
- [144] KOCHKODAN, V.; HILAL, N.: A comprehensive review on surface modified polymer membranes for biofouling mitigation. In: *Desalination* (356), 2015, 187–207.
- [145] KOCHKODAN, V.; HILAL, N.; GONCHARUK, V., et al.: Effect of the surface modification of polymer membranes on their microbiological fouling. In: *Colloid Journal* (68), 2006, 267–273.
- [146] LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D., et al.: Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. In: *Water Research* (42), 2008, 4591–4602.
- [147] ZODROW, K.; BRUNET, L.; MAHENDRA, S., et al.: Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. In: *Water Research* (43), 2009, 715–723.
- [148] MOZIA, S.: Photocatalytic membrane reactors (PMRs) in water and wastewater treatment. A review. In: *Separation and Purification Technology* (73), 2010, 71–91.
- [149] RAHIMPOUR, A.; MADAENI, S.; TAHERI, A., et al.: Coupling TiO₂ nanoparticles with UV irradiation for modification of polyethersulfone ultrafiltration membranes. In: *Journal of Membrane Science* (313), 2008, 158–169.
- [150] WINDLER, L.; HEIGHT, M.; NOWACK, B.: Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. In: *Environment international* (53), 2013, 62–73.
- [151] SUN, G.: Antimicrobial textiles, *Woodhead Publishing*, 2016.
- [152] GAO, Y.; CRANSTON, R.: Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. In: *Textile Research Journal* (78), 2008, 60–72.
- [153] HACKBARTH, S.; SCHLOTHAUER, J.; PREUSS, A., et al.: Highly sensitive time resolved singlet oxygen luminescence detection using LEDs as the excitation source. In: *Laser Physics Letters* (10), 2013, 125702.

- [154] SCHLOTHAUER, J.; HACKBARTH, S.; RÖDER, B.: A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence – revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination. In: *Laser Physics Letters* (6), 2008, 216–221.
- [155] SCHLOTHAUER, J.; RÖDER, B.; HACKBARTH, S., et al.: In vivo detection of time-resolved singlet oxygen luminescence under PDT relevant conditions. In: *DH Kessel, SPIE, San Francisco, California, USA* (7551), 2010, 755106–755109.
- [156] PFITZNER, S.; SCHLOTHAUER, J.; RÖDER, B., et al.: Time- and spectrally resolved singlet oxygen phosphorescence detection – discriminating disturbance signals. In: *Laser Physics* (28), 2018, 85702.
- [157] LOOFT, A.; PFITZNER, M.; PREUß, A., et al.: In vivo singlet molecular oxygen measurements: Sensitive to changes in oxygen saturation during PDT. In: *Photodiagnosis and photodynamic therapy* (23), 2018, 325–330.
- [158] SHAMALI, N.; PREUß, A.; SALTSMAN, I., et al.: In vitro photodynamic inactivation (PDI) of pathogenic germs inducing onychomycosis. In: *Photodiagnosis and photodynamic therapy* (24), 2018, 358–365.
- [159] PREUß, A.; BORNHÜTTER, T.; FARBER, A., et al.: Photodynamic inactivation of biofilm building microorganisms by photoactive facade paints. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (160), 2016, 79–85.
- [160] PREUß, A.; PFITZNER, M.; RÖDER, B.: Mosquito larvae control by photodynamic inactivation of their intestinal flora – a proof of principal study on *Chaoborus* sp. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (18), 2019.
- [161] MÜLLER, A.; PREUß, A.; RÖDER, B.: Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* – Correlation of singlet oxygen kinetics and phototoxicity. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (178), 2018.
- [162] POHL, J.; SALTSMAN, I.; MAHAMMED, A., et al.: Inhibition of green algae growth by corrole-based photosensitizers. In: *Journal of Applied Microbiology* (112), 2015, 305–312.
- [163] SARAN, M.: Bildung und Aktivitäten biologisch relevanter Sauerstoffspezies. In: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin - Grundlagen und Klinik 37, Springer Berlin Heidelberg*, 1987.

- [164] ELSTNER, E. F.; BORS, W.; WILMANN, W.: Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin – Grundlagen und Klinik, *Springer Berlin Heidelberg*, 1987.
- [165] RÖDER, B.: Biologische Bedeutung aktivierter Sauerstoffspezies (Übersichtsartikel). In: *Biologische Rundschau* (25), 1987.
- [166] LAUSTRIAT, G.: Molecular mechanisms of photosensitization. In: *Biochimie* (68), 1986, 771–778.
- [167] KANOFKY, J.: Chapter 5. Photosensitization. In: *Singlet Oxygen 1, Royal Society of Chemistry*, 2016.
- [168] KRASNOVSKY, A.: Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research. In: *Biochemistry (Moscow)* (72), 2007, 1065–1080.
- [169] PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J., et al.: Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. In: *Lasers in medical science* (24), 2009, 259–268.
- [170] RÖDER, B.: Einführung in die molekulare Photobiophysik, *Leipzig: Teubner Studienbücher*, 1999.
- [171] MÜLLER, A.: Photodynamische Inaktivierung eines gram-negativen Modellbakteriums – Korrelation von Singulett-Sauerstoff-Kinetik und Phototoxizität, Masterarbeit, 2015.
- [172] CHAPPLE, R.; INGLIS, B.; STEWART, P.: Lethal and mutational effects of solar and UV radiation on *Staphylococcus aureus*. In: *Archives of microbiology* (157), 1992, 242–248.
- [173] PFEIFER, G.; YOU, Y.-H.; BESARATINIA, A.: Mutations induced by ultraviolet light. In: *Mutation Research* (571), 2005, 19–31.
- [174] KRUMOVA, K.; COSA, G.: Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. In: *Singlet Oxygen 1, Royal Society of Chemistry*, 2016.
- [175] ERGAEG, K.; CHEVANNE, M.; CILLARD, J., et al.: Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. In: *Solar Energy* (82), 2008, 1107–1117.
- [176] DAHL, T.; MIDDEN, W.; HARTMAN, P.: Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. In: *Journal of Bacteriology* (171), 1989, 2188–2194.

- [177] DAHL, T.; ROBERTMIDDENAND, W.; HARTMAN, P.: Pure Singlet Oxygen Cytotoxicity for Bacteria. In: *Photochemistry and photobiology* (46), 1987, 345–352.
- [178] SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R.: Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. In: *Chemical Reviews* (103), 2003, 1685–1758.
- [179] KEARNS, D.: Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. In: *Chemical Reviews* (71), 1971, 395–427.
- [180] OGILBY, P.: Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. In: *Chemical Society reviews* (39), 2010, 3181–3209.
- [181] DEXTER, D.: A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. In: *The Journal of Chemical Physics* (21), 1953, 836–850.
- [182] SCHOLLES, G.: Long-range resonance energy transfer in molecular systems. In: *Annual review of physical chemistry* (54), 2003, 57–87.
- [183] SCHMIDT, R.: Photosensitized Generation of Singlet Oxygen. In: *Photochemistry and photobiology* (82), 2006, 1161–1177.
- [184] MILLER, H.; MCCORD, J.; CHOY, J., et al.: Measurement of the radiative lifetime of $O_2(a^1\Delta_g)$ using cavity ring down spectroscopy. In: *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* (69), 2001, 305–325.
- [185] HURST, J.; SCHUSTER, G.: Nonradiative relaxation of singlet oxygen in solution. In: *Journal of the American Chemical Society* (105), 1983, 5756–5760.
- [186] MINAEV, B.: Electronic mechanisms of molecular oxygen activation. In: *Russian Chemical Reviews* (76), 2007, 989–1011.
- [187] STAHL, W.; NICOLAI, S.; BRIVIBA, K., et al.: Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. In: *Carcinogenesis* (18), 1997, 89–92.
- [188] KRINSKY, N.: Antioxidant functions of carotenoids. In: *Free Radical Biology and Medicine* (7), 1989, 617–635.
- [189] CLENNAN, E.: Chapter 18. Overview of the Chemical Reactions of Singlet Oxygen. In: *Singlet Oxygen 1, Royal Society of Chemistry*, 2016.
- [190] BREGNHØJ, M.; WESTBERG, M.; MINAEV, B., et al.: Singlet Oxygen Photo-physics in Liquid Solvents. In: *Accounts of chemical research* (50), 2017, 1920–1927.

- [191] BOIX-GARRIGA, E.; RODRÍGUEZ-AMIGO, B.; PLANAS, O., et al.: Chapter 2. Properties of Singlet Oxygen. In: *Singlet Oxygen 1, Royal Society of Chemistry*, 2016.
- [192] HACKBARTH, S.; BORNHÜTTER, T.; RÖDER, B.: Chapter 26. Singlet Oxygen in Heterogeneous Systems. In: *Singlet Oxygen 2, Royal Society of Chemistry*, 2016.
- [193] BUSELMAIER, W.: Biologie für Mediziner, 11. völlig neubearbeitete Auflage, *Springer*, 2009.
- [194] CYPIONKA, H.: Grundlagen der Mikrobiologie, *Springer Berlin Heidelberg*, 2010.
- [195] JOSENHANS, C.; HAHN, H.: Bakterien: Definition und Aufbau. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Berlin Heidelberg*, 2012.
- [196] KŁODZIŃSKA, E.; SZUMSKI, M.; DZIUBAKIEWICZ, E., et al.: Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. In: *Electrophoresis* (31), 2010, 1590–1596.
- [197] POORTINGA, A.; BOS, R.; NORDE, W., et al.: Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. In: *Surface Science Reports* (47), 2002, 1–32.
- [198] JORI, G.; CAMERIN, M.; SONCIN, M., et al.: Chapter 1. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles. In: *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens, Royal Society of Chemistry*, 2011.
- [199] MELO, W. de; AVCI, P.; OLIVEIRA, M. de, et al.: Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. In: *Expert review of anti-infective therapy* (11), 2013, 669–693.
- [200] LAZZERI, D.; ROVERA, M.; PASCUAL, L., et al.: Photodynamic Studies and Photoinactivation of *Escherichia coli* Using meso-Substituted Cationic Porphyrin Derivatives with Asymmetric Charge Distribution. In: *Photochemistry and photobiology* (80), 2004, 286–293.
- [201] BANFI, S.; CARUSO, E.; BUCCAFURNI, L., et al.: Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (85), 2006, 28–38.
- [202] ALVES, E.; COSTA, L.; CARVALHO, C., et al.: Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. In: *BMC Microbiology* (9), 2009, 70–83.

- [203] NITZAN, Y.; PECHATNIKOV, I.: Chapter 3. Approaches to Kill Gram-negative Bacteria by Photosensitized Processes. In: *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*, Royal Society of Chemistry, 2011.
- [204] ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M.: New photosensitizers for photodynamic therapy. In: *The Biochemical journal* (473), 2016, 347–364.
- [205] MAISCH, T.: Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (150), 2015, 2–10.
- [206] ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; FAUSTINO, M., et al.: Chapter 5. Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. In: *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*, Royal Society of Chemistry, 2011.
- [207] ARTARSKY, S.; DIMITROVA, S.; BONNETT, R., et al.: Immobilization of zinc phthalocyanines in silicate matrices and investigation of their photobactericidal effect on *E. coli*. In: *The Scientific World Journal* (6), 2006, 374–382.
- [208] KALYANASUNDARAM, K.; NEUMANN-SPALLART, M.: Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous media. In: *The Journal of Physical Chemistry* (86), 1982, 5163–5169.
- [209] GOUTERMAN, M.: Spectra of porphyrins. In: *Journal of Molecular Spectroscopy* (6), 1961, 138–163.
- [210] GOUTERMAN, M.; WAGNIÈRE, G.; SNYDER, L.: Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. In: *Journal of Molecular Spectroscopy* (11), 1963, 108–127.
- [211] KALYANASUNDARAM, K.: Photochemistry of water-soluble porphyrins. In: *Inorganic Chemistry* (23), 1984, 2453–2459.
- [212] KNYUKSHTO, V.; SOLOVYOV, K.; EGOROVA, G.: Luminescence and structure of the protonated forms of meso-tetraarylporphyrins in solution. In: *Biospectroscopy* (4), 1998, 121–133.
- [213] REDMOND, R.; GAMLIN, J.: A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. In: *Photochemistry and photobiology* (70), 1999, 391–475.
- [214] IOSIF, A.; GRUMMT, U.-W.: Aggregation of Tetrakis (4-methylpyridyl) porphyrin and tetrakis (4-sulphonatophenyl) porphyrin in water. In: *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung* (339), 1997, 420–425.

- [215] GONÇALVES, P.; FRANZEN, P.; CORREA, D., et al.: Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP). In: *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and bio-molecular spectroscopy* (79), 2011, 1532–1539.
- [216] BORISSEVITCH, I.; GANDINI, S.: Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl)porphyrin bound to DNA. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (43), 1998, 112–120.
- [217] GONÇALVES, P.; BONI, L. de; NETO, N., et al.: Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra (sulfonatophenyl) porphyrin. In: *Chemical physics letters* (407), 2005, 236–241.
- [218] VERGELDT, F.; KOEHORST, R.; VAN HOEK, A., et al.: Intramolecular interactions in the ground and excited states of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins. In: *The Journal of Physical Chemistry* (99), 1995, 4397–4405.
- [219] ECKL, D.; DENGLER, L.; NEMMERT, M., et al.: A Closer Look at Dark Toxicity of the Photosensitizer TMPyP in Bacteria. In: *Photochemistry and photobiology* (), 2017.
- [220] ERGAIEG, K.; SEUX, R.: A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue. In: *Desalination* (246), 2009, 353–362.
- [221] EICHNER, A.; GONZALES, F.; FELGENTRÄGER, A., et al.: Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and Candida within seconds. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (12), 2013, 135–147.
- [222] CAMINOS, D.; SPESIA, M.; DURANTINI, E.: Photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (5), 2006, 56–65.
- [223] MEINHARDT, F.; JESKE, S.: Modellorganismen. In: *Praktikum der Molekulargenetik* 287, Springer-Verlag, 2005.
- [224] GASTMEIER, P.: Nosokomiale Infektionen. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Berlin Heidelberg*, 2012.
- [225] SCHMIDT, R.: Deactivation of O₂ (¹Δ_g) Singlet Oxygen by Carotenoids: Internal Conversion of Excited Encounter Complexes. In: *The Journal of Physical Chemistry A* (108), 2004, 5509–5513.

- [226] PASTERNAK, R.; HUBER, P.; BOYD, P., et al.: On the aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. In: *Journal of the American Chemical Society* (94), 1972, 4511–4517.
- [227] ČUNDERLÍKOVÁ, B.; BJØRKLUND, E.; PETTERSEN, E., et al.: pH-Dependent Spectral Properties of HpIX, TPPS2a, mTHPP and mTHPC. In: *Photochemistry and photobiology* (74), 2001, 246–252.
- [228] DAIROU, J.; VEVER-BIZET, C.; BRAULT, D.: Self-association of Disulfonated Deuteroporphyrin and its Esters in Aqueous Solution and Photosensitized Production of Singlet Oxygen by the Dimers. In: *Photochemistry and photobiology* (75), 2002, 229–236.
- [229] BORISSEVITCH, I.; TOMINAGA, T.; SCHMITT, C.: Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (114), 1998, 201–207.
- [230] RABEK, J.; RANBY, B.: The Role of Singlet Oxygen in the Photooxidation of Polymers. In: *Photochemistry and photobiology* (28), 1978, 557–569.
- [231] OGILBY, P.; KRISTIANSEN, M.; CLOUGH, R.: Singlet oxygen formation in a solid organic polymer upon irradiation of the oxygen-polymer charge-transfer band. In: *Macromolecules* (23), 1990, 2698–2704.
- [232] HJORTH TØNNESEN, H.: Photostability of Drugs and Drug Formulations, Second Edition, *CRC Press*, 2004.
- [233] KUZNETSOVA, N.; MAKAROV, D.; YUZHAKOVA, O., et al.: Study on the photostability of water-soluble Zn(II) and Al(III) phthalocyanines in aqueous solution. In: *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* (14), 2010, 968–974.
- [234] MOSINGER, J.; LANG, K.; KUBÁT, P., et al.: Photofunctional polyurethane nanofabrics doped by zinc tetraphenylporphyrin and zinc phthalocyanine photosensitizers. In: *Journal of fluorescence* (19), 2009, 705–713.
- [235] REDDI, E.; CECCON, M.; VALDUGA, G., et al.: Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins. In: *Photochemistry and photobiology* (75), 2002, 462–470.
- [236] SIMMONS, E.: Diffuse reflectance spectroscopy: a comparison of the theories. In: *Applied optics* (14), 1975, 1380–1386.

- [237] NOBBS, J.: Kubelka-Munk Theory and the Prediction of Reflectance. In: *Review of Progress in Coloration and Related Topics* (15), 1985, 66–75.
- [238] KORTÜM, G.: Reflexionsspektroskopie – Grundlagen, Methodik, Anwendungen, *Springer*, 1969.
- [239] VÖLZ, H.: Optische Eigenschaften von Pigmenten und objektive Methoden zu ihrer Prüfung und Bewertung. In: *Angewandte Chemie* (87), 1975, 721–731.
- [240] BORNHÜTTER, T.: Nutzung der orts- und zeitaufgelösten Detektion der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz zur Evaluierung der Photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen, Dissertation, 2017.
- [241] SCHLOTHAUER, J.: Zeitaufgelöster Nachweis von Singulett-Sauerstoff, Diplomarbeit, 01.01.2009.
- [242] BIRCH, D.; IMHOF, R.h.: Time-Domain Fluorescence Spectroscopy Using Time-Correlated Single-Photon Counting. In: *Topics in Fluorescence Spectroscopy 1*, *Kluwer Academic Publishers*, 2002.
- [243] SCHLOTHAUER, J.: Current prospects of detectors for high performance time-resolved singlet oxygen luminescence detection. (Konferenzbeitrag: First Sino-German Symposium on “Singlet molecular oxygen and photodynamic effects”). In: *Photonics & Lasers in Medicine* (4), 2015, 303–306.
- [244] LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVÁ, D.: Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. In: *Coordination Chemistry Reviews* (248), 2004, 321–350.
- [245] BAIER, J.; FUß, T.; PÖLLMANN, C., et al.: Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (87), 2007, 163–173.
- [246] PAUL, A.; HACKBARTH, S.; MOLICH, A., et al.: Comparative study of the photosensitization of Jurkat cells in vitro by pheophorbide-a and a pheophorbide-a diaminobutane poly-propylene-imine dendrimer complex. In: *Laser Physics* (13), 2003, 22–29.
- [247] FREDERIKSEN, P.; MCILROY, S.; NIELSEN, C., et al.: Two-photon photosensitized production of singlet oxygen in water. In: *Journal of the American Chemical Society* (127), 2005, 255–269.

- [248] LAKOWICZ, J.: Time-Domain Lifetime Measurements. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 59, Springer US, 2006.
- [249] JOHNSON, M.: The analysis of ligand-binding data with experimental uncertainties in the independent variables. In: *Analytical Biochemistry* (148), 1985, 471–478.
- [250] NISHIMURA, G.; TAMURA, M.: Artefacts in the analysis of temporal response functions measured by photon counting. In: *Physics in medicine and biology* (50), 2005, 1327–1342.
- [251] JAMES, D.; WARE, W.: A fallacy in the interpretation of fluorescence decay parameters. In: *Chemical physics letters* (120), 1985, 455–459.
- [252] JAMES, D.; WARE, W.: Recovery of underlying distributions of lifetimes from fluorescence decay data. In: *Chemical physics letters* (126), 1986, 7–11.
- [253] HACKBARTH, S.; SCHLOTHAUER, J.; PREUß, A., et al.: New insights to primary photodynamic effects - Singlet oxygen kinetics in living cells. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (98), 2010, 173–179.
- [254] HACKBARTH, S.; SCHLOTHAUER, J.; PREUß, A., et al.: Time resolved sub-cellular singlet oxygen detection - ensemble measurements versus single cell experiments. In: *Laser Physics Letters* (9), 2012, 474–480.
- [255] HACKBARTH, S.; RÖDER, B.: Singlet oxygen luminescence kinetics in a heterogeneous environment – identification of the photosensitizer localization in small unilamellar vesicles. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (14), 2015, 329–334.
- [256] ZEUGNER, L.: Etablierung von Methoden zur Photodynamischen Inaktivierung von Bakterien, *Humboldt-Universität zu Berlin*, 2011.
- [257] PFITZNER, M.: Untersuchung verschiedener Corrole hinsichtlich ihrer Eignung zur Photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen, Masterarbeit, 2013.
- [258] CIEPLIK, F.; PUMMER, A.; REGENSBURGER, J., et al.: The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. In: *Frontiers in microbiology* (6), 2015, 706.
- [259] KIESSLICH, T.; GOLLMER, A.; MAISCH, T., et al.: A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. In: *BioMed research international* (2013), 2013, 840417.

- [260] MILES, A.; MISRA, S.; IRWIN, J.: The estimation of the bactericidal power of the blood. In: *Journal of Hygiene* (38), 1938, 732–749.
- [261] HEDGES, A.: Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. In: *International Journal of Food Microbiology* (76), 2002, 207–214.
- [262] RESCH-GENDER, U.: Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I 5, *Springer Berlin Heidelberg*, 2008.
- [263] STEFFEN, R.; WALLNER, G.; REKSTAD, J., et al.: General characteristics of photoluminescence from dry heat aged polymeric materials. In: *Polymer Degradation and Stability* (134), 2016, 49–59.
- [264] STAUDE, E.: Membranen und Membranprozesse, *VCH*, 1992.
- [265] OHLROGGE, K.; EBERT, K.: Membranen – Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 2006.
- [266] ULBRICHT, M.; SCHUSTER, O.; ANSORGE, W., et al.: Influence of the strongly anisotropic cross-section morphology of a novel polyethersulfone microfiltration membrane on filtration performance. In: *Separation and Purification Technology* (57), 2007, 63–73.
- [267] GABRIELS, J.: Using A New, Fast Flow, Low Protein Binding Membrane for Sterile Filtration – Application Note, 2003.
- [268] LOFFELMANN, W.; PASSLACK, J.; SCHMITT, H., et al.: Polysulfone membrane and method for its manufacture. – US Pat 5,879,554.
- [269] RABILLER-BAUDRY, M.; BOUZIN, A.; HALLERY, C., et al.: Evidencing the chemical degradation of a hydrophilised PES ultrafiltration membrane despite protein fouling. In: *Separation and Purification Technology* (147), 2015, 62–81.
- [270] Merck KGaA: Millipore Express PLUS Membran, Polyethersulfon, hydrophil, 0,22 µm, 47 mm. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Millipore-Express-PLUS-Membrane-Filter,MM_NF-GPWP04700. Zuletzt aufgerufen am 26. Juli 2019.
- [271] CLELAND, M.; PARKS, L.; CHENG, S.: Applications for radiation processing of materials. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* (208), 2003, 66–73.
- [272] MAKUUCHI, K.; CHENG, S.: Radiation Processing of Polymer Materials and its Industrial Applications, *John Wiley & Sons, Inc*, 2012.

- [273] KESZLER, B.; KOVÁCS, G.; TÓTH, A., et al.: Modified polyethersulfone membranes. In: *Journal of Membrane Science* (62), 1991, 201–210.
- [274] HAUTOJÄRVI, J.; KONTTURI, K.; NÄSMAN, J., et al.: Characterization of Graft-Modified Porous Polymer Membranes. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* (35), 1996, 450–457.
- [275] LIU, F.; DU, C.-H.; ZHU, B.-K., et al.: Surface immobilization of polymer brushes onto porous poly(vinylidene fluoride) membrane by electron beam to improve the hydrophilicity and fouling resistance. In: *Polymer* (48), 2007, 2910–2918.
- [276] STARKE, S.; WENT, M.; PRAGER, A., et al.: A novel electron beam-based method for the immobilization of trypsin on poly (ethersulfone) and poly (vinylidene fluoride) membranes. In: *Reactive and functional polymers* (73), 2013, 698–702.
- [277] SCHULZE, A.; STOELZER, A.; STRIEGLER, K., et al.: Biocatalytic Self-Cleaning Polymer Membranes. In: *Polymers* (7), 2015, 1837–1849.
- [278] MARLETTA, G.; PIGNATARO, S.; TOTH, A., et al.: X-ray, electron, and ion beam induced modifications of poly(ether sulfone). In: *Macromolecules* (24), 1991, 99–105.
- [279] SCHULZE, A.; MARQUARDT, B.; KACZMAREK, S., et al.: Electron Beam-Based Functionalization of Poly (ethersulfone) Membranes. In: *Macromolecular rapid communications* (31), 2010, 467–472.
- [280] SCHULZE, A.; MARQUARDT, B.; WENT, M., et al.: Electron beam-based functionalization of polymer membranes. In: *Water Science and Technology* (65), 2012, 574–580.
- [281] ULBRICHT, M.: Advanced functional polymer membranes. In: *Polymer* (47), 2006, 2217–2262.
- [282] MÜLLER, A.; PREUß, A.; BORNHÜTTER, T., et al.: Electron beam functionalized photodynamic polyethersulfone membranes – photophysical characterization and antimicrobial activity. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (17), 2018.
- [283] HOLLINGSWORTH, J.; RICHARD, A.; VICENTE, M., et al.: Characterization of the self-assembly of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin (H_2TPPS^4-) in aqueous solutions. In: *Biomacromolecules* (13), 2012, 60–72.

- [284] LEE, S.; JEON, S.; KIM, B.-J., et al.: Classification of CD and absorption spectra in the Soret band of H₂TMPP bound to various synthetic polynucleotides. In: *Biophysical Chemistry* (92), 2001, 35–45.
- [285] LEE, S.; LEE, Y.; LEE, H., et al.: Rotation of Periphery Methylpyridine of meso-Tetrakis(*n*-N-methylpyridiniumyl)porphyrin (*n* = 2, 3, 4) and Its Selective Binding to Native and Synthetic DNAs. In: *Biophysical Journal* (83), 2002, 371–381.
- [286] PASTERNAK, R.; GIBBS, E.; VILLAFRANCA, J.: Interactions of porphyrins with nucleic acids. In: *Biochemistry* (22), 1983, 5409–5417.
- [287] ALY, S.; EITA, M.; KHAN, J., et al.: Remarkable Fluorescence Enhancement versus Complex Formation of Cationic Porphyrins on the Surface of ZnO Nanoparticles. In: *The Journal of Physical Chemistry C* (118), 2014, 12154–12161.
- [288] DIAS, P.; FARIA, D. de; LEOPOLDO CONSTANTINO, V.: Clay-porphyrin systems: spectroscopic evidence of TMPyP Protonation, non-planar distortion and meso substituent rotation. In: *Clays and Clay Minerals* (53), 2005, 361–371.
- [289] RYCHTARIKOVA, R.; SABATA, S.; HETFLÉJS, J., et al.: Composites with photo-sensitive 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin entrapped into silica gels. In: *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (61), 2012, 119–125.
- [290] DOLANSKÝ, J.; HENKE, P.; KUBÁT, P., et al.: Polystyrene Nanofiber Materials for Visible-Light-Driven Dual Antibacterial Action via Simultaneous Photogeneration of NO and O₂(¹Δ_g). In: *ACS applied materials & interfaces* (7), 2015, 22980–22989.
- [291] GOUTERMAN, M.: Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings. In: *The Porphyrins, Elsevier*, 1978.
- [292] GLÜCK, A.: Photophysikalische Charakterisierung und PDI-Testung von TMPyP-dotierten PES-Membranen, Masterarbeit, 2018.
- [293] HACKBARTH, S.; PFITZNER, S.; GUO, L., et al.: Singlet Oxygen Kinetics in Polymeric Photosensitizers. In: *The Journal of Physical Chemistry C* (122), 2018, 12071–12076.
- [294] FELGENTRÄGER, A.; MAISCH, T.; SPÄTH, A., et al.: Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial

- effects on *Staphylococcus aureus*. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* (16), 2014, 20598–20607.
- [295] FELGENTRÄGER, A.: Study of potential photosensitizers for self-disinfecting surfaces using the method of antimicrobial photodynamic action, 01.01.2013.
- [296] OGILBY, P.; DILLON, M.; KRISTIANSEN, M., et al.: Quenching of singlet oxygen in solid organic polymers. In: *Macromolecules* (25), 1992, 3399–3405.
- [297] CLOUGH, R.; DILLON, M.; IU, K., et al.: Behavior of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g\text{O}_2$) in a polymer matrix. In: *Macromolecules* (22), 1989, 3620–3628.
- [298] GHOSAL, K.; CHERN, R.; FREEMAN, B.: Gas permeability of radel a polysulfone. In: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* (31), 1993, 891–893.
- [299] GAO, Y.; BACA, A.; WANG, B., et al.: Activation Barriers for Oxygen Diffusion in Polystyrene and Polycarbonate Glasses: Effects of Low Molecular Weight Additives. In: *Macromolecules* (27), 1994, 7041–7048.
- [300] POULSEN, L.; ZEBGER, I.; TOFTE, P., et al.: Oxygen Diffusion in Bilayer Polymer Films. In: *The Journal of Physical Chemistry B* (107), 2003, 13885–13891.
- [301] PREUß, A.; ZEUGNER, L.; HACKBARTH, S., et al.: Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer. In: *Journal of Applied Microbiology* (114), 2012, 36–43.
- [302] LEE, M.; ONG, C.; LAU, W., et al.: Degradation of PVDF-based composite membrane and its impacts on membrane intrinsic and separation properties. In: *Journal of Polymer Engineering* (36), 2016, 398.
- [303] KOURDE-HANAFI, Y.; LOULERGUE, P.; SZYMCHYK, A., et al.: Influence of PVP content on degradation of PES/PVP membranes: Insights from characterization of membranes with controlled composition. In: *Journal of Membrane Science* (533), 2017, 261–269.
- [304] GRIFFING, J.; REMINGTON, W.: Sulfonate containing polyesters dyeable with basic dyes – US Pat 3,018,272.
- [305] KIM, Y.; SUN, G.: Functional Finishing of Acrylic and Cationic Dyeable Fabrics: Intermolecular Interactions. In: *Textile Research Journal* (72), 2002, 1052–1056.

- [306] MENEZES, E.: Dyeing of cationic dyeable polyester with cationic dyes. In: *Journal of the Textile Association* (63), 2002, 291–293.
- [307] BERNARD, W.: Praxis des Bleichens und Färbens von Textilien, *Springer Berlin Heidelberg*, 1966.
- [308] BERNARD, W.: Appretur der Textilien, *Springer Berlin Heidelberg*, 1960.
- [309] PorphyChem SAS, Dijon, FRA: <https://shop.porphychem.com/products.html/>. Zuletzt aufgerufen am 24.10.2019.
- [310] PROROKOVA, N.; CHOREV, A.; KUZMIN, S., et al.: Surface Activation of Fibrous PET Materials. In: *Advances in Sustainable Petroleum Engineering Science* (5), 2013, 105–120.
- [311] Birgit Armbruster, TITV Greiz Textilforschungsinstitut Thüringen-Vogtland: Faseröffnung PET-Gewebe und minimale Färbetemperatur im Ausziehverfahren, HEPS Projekttreffen (Berlin), 28.03.2019.
- [312] BOBETH, W.: Textile Faserstoffe, *Springer Berlin Heidelberg*, 1993.
- [313] NEELY, A.; MALEY, M.: Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. In: *Journal of clinical microbiology* (38), 2000, 724–726.
- [314] MÜLLER, A.; RÖDER, B.: Textilprüfung HUB ab 07/2019 – HEPS Projekttreffen, 15.10.2019.
- [315] MÜLLER, A.; PREUß, A.; RÖDER, B.: HUB Kooperationstreffen AG PBP/BörnerLab: Catechol-modifiziertes mTHPC für die Funktionalisierung von Oberflächen, Berlin, 18.09.2019.
- [316] DECRAENE, V.; PRATTEN, J.; WILSON, M.: Cellulose acetate containing toluidine blue and rose bengal is an effective antimicrobial coating when exposed to white light. In: *Applied and environmental microbiology* (72), 2006, 4436–4439.
- [317] MASILELA, N.; KLEYI, P.; TSHENTU, Z., et al.: Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using low symmetrically substituted phthalocyanines supported on a polystyrene polymer fiber. In: *Dyes and Pigments* (96), 2013, 500–508.
- [318] MANAGA, M.; ANTUNES, E.; NYOKONG, T.: Conjugates of platinum nanoparticles with gallium tetra – (4-Carboxyphenyl) porphyrin and their use in photodynamic antimicrobial chemotherapy when in solution or embedded in electrospun fiber. In: *Polyhedron* (76), 2014, 94–101.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1-1** Zunahme des Anteils gramnegativer *Escherichia coli* mit einer Resistenz gegen das Breitspektrum-Cephalosporin dritter Generation in Blut- und Liquor-Isolaten: am EARS-Netzwerk teilnehmende Länder im Zeitraum zwischen 2006 und 2018, adaptiert nach [7, 24].....17
- Abb. 1.1-2** Gegenüberstellung weltweit neuzugelassener Antibiotika und Hospital-assoziiierter MRSA in Deutschland sowie den USA zwischen 1983 und 2007, adaptiert nach [25].17
- Abb. 2.1-1** Vereinfachte schematische Darstellung des Photodynamischen Effektes [171]. Schritt 1: Anregung des PS vom Singulett- (^1PS) in den Triplettzustand ($^3\text{PS}^*$) nach Lichtabsorption ($h\nu$) und Interkombination (ISC). Schritt 2: Erzeugung von ROS nach Ladungstransfer (LT: Typ-I-Mechanismus) oder Energietransfer (ET: Typ-II-Mechanismus) unter Beteiligung von Sauerstoff im Grundzustand ($^3\text{O}_2$). Schritt 3: Oxidation von Biomolekülen durch die gebildeten ROS.....29
- Abb. 2.2-1** Jablonski-Diagramm zur vereinfachten Illustration des Typ-II Mechanismus und der beteiligten Übergänge bei der Bildung und Desaktivierung von $^1\text{O}_2$ [171]. Ratenkonstanten k für FL: Fluoreszenz, Ph: Phosphoreszenz, IC: innere Umwandlung, ISC: Intersystem Crossing, n/r: nicht-strahlende Desaktivierung, ET: Energietransfer, q: Quenching. S, T: Singulett- bzw. Triplettzustand des PS, $^3\Sigma_g^-$ und $^1\Delta_g$ Termschemata des Grund- bzw. ersten angeregten Singulettzustands von molekularem Sauerstoff.32
- Abb. 2.3-1** Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus grampositiver und gramnegativer Bakterien in physiologischer Umgebung [171]. (1) periplasmatischer Raum, (2) Plasmamembran, (3) Cytoplasma, (4) Murein, (5) äußere Membran.35
- Abb. 2.4-1** Auf die jeweiligen Maxima normierten Absorptions- und Fluoreszenzspektren von TMPyP und TPPS in H_2O . Die grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften können der Tab. 2.4-1 entnommen werden.39
- Abb. 3.1-1** Strukturformeln der für die Funktionalisierungen verwendeten PS-Salze. TMPyP ist vierfach kationisch, TPPS vierfach anionisch, TriMPyP dreifach kationisch.43

Abb. 3.2-1 Diagramm der grundlegenden Methodik zur Charakterisierung PDI-aktiver Polymeroberflächen mit drei Haupt- und drei Untersegmenten.	44
Abb. 3.2-2 Beispielhafte Darstellung einer orts aufgelösten Fluoreszenz- (oben) und NIR-Lumineszenzmessung (unten). Links: Orts aufgelöste Darstellung der Fluoreszenz- und NIR-Lumineszenz-Scans (1270 ± 15 nm FWHM) einer mit TMPyP funktionalisierten Textilprobe. Rechts: Messsignale der farblich entsprechend hervorgehobenen Pixel im 2D-Scan. Es wurden die Pixel mit dem stärksten und dem schwächsten Gesamtsignal markiert.	48
Abb. 3.2-3 Technische Zeichnung der Beleuchtungsanlage mit Gehäuse (grau), LED-Array (braun), Milchglas (weiß) und Kühlung (schwarz).....	53
Abb. 3.2-4 Gegenüberstellung der Emission der verwendeten Beleuchtungsanlage (BA) und der beiden PS bei gleicher Konzentration. Die Absorption ist <i>photonenecht</i> dargestellt, entspricht hier also der absorbierten Strahlungsleistungsdichte. Im Resultat hat TMPyP einen um Faktor $1,7 \pm 0,1$ größeren spektralen Überlapp mit der BA-Emission als TPPS.	53
Abb. 3.2-5 Foto zur Illustration eines M&M-Versuchs. Beispielhafte Verdünnungsreihen einer Dunkelkontrolle (links), Probe mit geringem phototoxischen Effekt (Mitte) und Probe mit einem phototoxischen Effekt jenseits des Zähllimits (rechts). Die Verdünnungsreihe beginnt jeweils im rechtsseitigen obersten sechstel und läuft im Uhrzeigersinn durch.	55
Abb. 4.2-1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der kleinporigen Seiten einer unmodifizierten und unbestrahlten (R) und mit TMPyP bei 200 kGy e-Strahl-funktionalisierten Membran (T). [282].....	62
Abb. 4.2-2 Fotos der in diesem Abschnitt untersuchten ungefärbten Referenz-Membranen (R), der mit TMPyP bzw. TPPS gefärbten (T0 bzw. TS0) sowie der gefärbten und e-Strahl-funktionalisierten (T bzw. TS) Membranen. Links: Alle Membranen liegen mit der kleinporigen Vorderseite nach oben. Mitte/rechts: Vergleich der Vorderseite (vs) und der Rückseite (rs) der T- und der TS-Membran.	63
Abb. 4.2-3 DRUV-Spektren (Kubelka-Munk-Darstellung) der Membranoberflächen. Die Reflexion der Vorder- (vs) und Rückseite (rs) der Membranen wurde jeweils gegen die entsprechende Seite einer	

unbehandelten Referenzmembran als Standard gemessen. Bezeichnungen: TMPyP- (T/T0) und TPPS-dotierte (TS/TS0) e-Strahl-funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte Membran.....64

Abb. 4.2-4 Nachweis der PS-Fluoreszenz auf den Membranoberflächen und der Vergleich zwischen ihrer Vorderseite (vs) und Rückseite (rs). Es wurde jeweils die integrierte Gesamtemission von 600 bis 1000 nm über einen Fluoreszenzscan von 6×6 Pixeln (1 mm Schrittweite) gemittelt. Die Fehlerbalken wurden aus der Standardabweichung (n=36) und Justagegenauigkeit abgeschätzt. Bezeichnungen: TMPyP- (T/T0) und TPPS-dotierte (TS/TS0) e-Strahl-funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte Membran.....66

Abb. 4.2-5 Vergleich der normierten Fluoreszenzspektren der Vorder- (vs) und Rückseite (rs) der TMPyP-dotierten (links, T/T0: e-Strahl-funktionalisiert/nicht-funktionalisiert) und TPPS-dotierten (rechts, TS/TS0: e-Strahl-funktionalisiert/nicht-funktionalisiert) Membranen. Die Anregung erfolgte im jeweiligen Soret-Maximum aus den DRUV-Messungen (Abb. 4.2-3).67

Abb. 4.2-6 Zeitaufgelöste ¹O₂-Lumineszenz trocken oder nass an Vorder- (vs) und Rückseite (rs) vermessener Membranen. Es wurden 6 x 6-Pixel-Raster à 1mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale sind über alle 36 Messpixel eines Scans aufsummiert. Bezeichnungen: TMPyP- (T/T0) und TPPS-dotierte (TS/TS0) e-Strahl-funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte Membranen.....68

Abb. 4.2-7 Im EtOH-Extrakt gemessene Absorptionsspektren nach 24-stündiger Inkubation der e-Strahl-funktionalisierten TPPS-dotierten (TS) sowie e-Strahl-funktionalisierten und nicht-funktionalisierten TMPyP-dotierten (T/T0) Membranen in EtOH (jeweils sechs 10mm-Membranen in 6 ml EtOH).....71

Abb. 4.2-8 Foto der PS-Abdrücke der e-Strahl-funktionalisierten TPPS-dotierten (TS) sowie e-Strahl-funktionalisierten und nicht-funktionalisierten TMPyP-dotierten (T/T0) Membranen nach 48-stündiger Lagerung auf nassem Filterpapier. Die zugehörigen Proben sind direkt über den Abdrücken platziert.72

Abb. 4.3-1 PDI des gramnegativen *E. coli* bzw. des grampositiven *M. luteus* durch e-Strahl-funktionalisierte TMPyP- (T) und TPPS-dotierte (TS) Membranen im Vergleich zu Referenzmembranen (R) nach zweitägiger Dauerbeleuchtung mit Weißlicht. Die mit *E. coli* inokulierten Proben wurden mit 4 ± 1 mW/cm² und die mit *M. luteus* inokulierten Proben mit $1,0 \pm 0,5$ mW/cm² beleuchtet. Die Dunkelkontrollen sind mit einem • markiert. Der Versuch wurde an den großen (47 mm Durchmesser) Membranen durchgeführt. Für eine bessere Sichtbarkeit der Bakterien wurde eine nachträgliche Korrektur der Gradationskurve durchgeführt. Die auf den beleuchteten T- und TS-Membranen gut sichtbaren hellen Flecken sind auf Luft einschüsse unter den Membranen zurückzuführen.....73

Abb. 4.3-2 Links: PDI von *E. coli* auf den R-, T- und TS-Membranen. Die Bestrahlung wurde mit der PS-Extinktion/LED-Emission gewichtet (cf. Abb. 3.2-4) und erfolgte für jeweils zwei Stunden bei 4 ± 1 mW/cm² (T) bzw. 8 ± 1 mW/cm² (TS und R). **Rechts:** PDI von *E. coli* auf den R- und T-Membranen nach 10, 30 und 60 Minuten. Die Weißlichtbestrahlung erfolgte bei 4 ± 1 mW/cm². Bezeichnungen: Referenzmembranen (R), TMPyP- (T) und TPPS-funktionalisierte (TS) Membranen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 18 Zählungen. Das jeweilige Zähllimit ist gestrichelt markiert. Die Zählwerte sind auf die jeweilige dunkel inkubierte Referenzmembran normiert.74

Abb. 4.4-1 Fluoreszenz- und Streulichtaufnahmen mit TMPyP und TPPS (50 µM) inkubierter Bakteriensuspensionen (10^8 KBE/ml *E. coli* in PBS) – Anregung bei 405 nm, Emission zwischen 650 und 750 nm. Die Einfärbung des Fluoreszenzsignals wurde willkürlich gewählt.....76

Abb. 4.4-2 Fluoreszenz- und Streulichtaufnahmen der Vorderseite der TMPyP-funktionalisierten Membranen getränkt mit Bakteriensuspension (10 µl mit 10^8 KBE/ml *E. coli* in PBS) – Anregung bei 405 nm, Emission bei 650 bis 750 nm. Die Aufnahmen erfolgten unmittelbar nach Inokulation (obere Bildreihe) und 18 Minuten später (untere Bildreihe).....77

Abb. 4.4-3 Absorptionsmessung im Extrakt mit 1 ml mit PBS gespülter Membranen nach einem PDI-Experiment mit *E. coli*. Bezeichnungen: e-Strahl-funktionalisierte TPPS-dotierte (TS) und funktionalisierte bzw. nicht-funktionalisierte TMPyP-dotierte (T/T0) Membranen.....78

Abb. 4.5-1 Abschätzung einer möglichen Photodegradation des Membranmaterials mittels Volumenstrommessungen nach bis zu 21-tägiger Dauerbeleuchtung der TMPyP-funktionalisierten (T) Membranen im Vergleich zu den Referenzmembranen (R) mit $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$. Die Fehlerbalken wurden durch Fehlerfortpflanzung aus den Unsicherheiten der Volumen-, Zeit- und Druckmessung sowie Standardabweichung (n=12) ermittelt.	79
Abb. 4.5-2 Photostabilität der TMPyP- (T) und TPPS-funktionalisierten (TS) Membranen – im Balkendiagramm ist die über ein 6x6-Pixel-Raster gemittelte Abnahme der Fluoreszenzemission der Proben nach bis zu 14-tägiger Weißlichtbeleuchtung mit $4 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ dargestellt. Die Fehlerbalken wurden aus der Standardabweichung (n=36) und Justagegenauigkeit abgeschätzt. In der Mitte ist ein Foto der Membranen und ihrer Dunkelkontrollen (•) nach 14 Tagen abgebildet.	80
Abb. 5.2-1 Absorptionsspektren von TMPyP und seinem einfach substituierten Derivat TriMPyP in wässriger Lösung.	90
Abb. 5.2-2 Fluoreszenzspektren (links) und zeitaufgelöste $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz (rechts) von TMPyP und seinem einfach substituierten Derivat TriMPyP in wässriger Lösung zur relativen Bestimmung der entsprechenden Quantenausbeuten. Die Anregung der beiden Messungen erfolgte bei 405 nm bei einer festen optischen Dichte von 0,04.	90
Abb. 5.2-3 Foto der drei kovalent unterschiedlich funktionalisierten Proben K1 bis K3 und ihrer entsprechenden Farbabdrücke nach 48-stündiger Lagerung auf nassem FP (links). Rechts: Foto der ungefärbten Textilsubstrate PET ⁺ und PET ^a	91
Abb. 5.2-4 Nachweis der TriMPyP-Fluoreszenz auf den drei kovalent funktionalisierten Oberflächen (K1 bis K3) im 2D-Fluoreszenzscan: Fluoreszenzspektren und die zugehörige Gesamtemission (Balkendiagramm). Im Diagramm wurde jeweils die integrierte Gesamtemission von 600 bis 1000 nm über einen Scan von 6×6 Pixeln (1 mm Schrittweite) gemittelt. Die Fehler wurden aus der Standardabweichung (n=36) und Justagegenauigkeit abgeschätzt.	92
Abb. 5.3-1 Textiltechnologisch funktionalisierte Proben und ungefärbtes Substratgewebe (PET ⁺). Bezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren	

gefärbt und nachbehandelt), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbt und nachbehandelt).93

Abb. 5.3-2 Kubelka-Munk-Funktion der DRUV-Spektren der textiltechnologisch funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zum Absorptionsspektrum des frei gelösten TMPyP (in H₂O). Die Q-Banden sind zehnfach vergrößert dargestellt. Die Reflexionsmessungen erfolgten gegen unbehandeltes PES⁺-Gewebe als Standard. Probenbezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbte nachbehandelte Proben), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte und nachbehandelte Proben)94

Abb. 5.3-3 Fotos der drei textiltechnologisch gefärbten und nachbehandelten (I1nb, A1nb, A2nb) bzw. nicht nachbehandelten (I1, A1, A2) Proben sowie der entsprechenden Farbabdrücke nach 48-stündiger Lagerung auf nassem FP. Probenbezeichnungen: I1 (im Imprägnierverfahren gefärbte Proben), A1 und A2 (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte Proben)95

Abb. 5.3-4 Absorptionsspektren gemessen im EtOH-Extrakt nach 48-stündiger Inkubation (2,6 cm²-Gewebe in 6 ml EtOH) der im Imprägnierverfahren gefärbten und nachbehandelten Probe I1nb im Vergleich zu zwei nicht nachbehandelten Probenvarianten I1 (Färbung mit und ohne Bindersystem). Für die Proben I1 und I1nb ist zusätzlich ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt.....96

Abb. 5.3-5 Nachweis der TMPyP-Fluoreszenz auf den textiltechnologisch funktionalisierten Oberflächen im 2D-Fluoreszenzscan: Fluoreszenzspektren und die zugehörige Gesamtemission (Balkendiagramm). Im Balkendiagramm wurde jeweils die integrierte Gesamtemission von 600 bis 1000 nm über einen Fluoreszenzscan von 6×6 Pixeln (1 mm Schrittweite) gemittelt. Die Fehlerbalken wurden aus der Standardabweichung (n=36) und Justagegenauigkeit abgeschätzt. Probenbezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbte nachbehandelte Proben), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte und nachbehandelte Proben)97

Abb. 5.4-1 Zeitaufgelöster ¹O₂-Nachweis auf den textiltechnologisch (I1nb: Imprägnierverfahren, A1nb und A2nb: Ausziehverfahren) funktionalisierten

Probenoberflächen in Abhängigkeit der Mikroumgebung (trocken/nass). Es wurden 6 x 6-Pixel-Raster à 1 mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale wurden über alle 36 Messpixel aufsummiert. Rechtseitig sind die auf das Maximum normierten Signale dargestellt.....99

Abb. 5.4-2 Zeitaufgelöster $^1\text{O}_2$ -Nachweis auf den drei kovalent (K1 bis K3) unterschiedlich funktionalisierten Probenoberflächen in Abhängigkeit der Mikroumgebung (trocken/nass). Es wurden 6 x 6-Pixel-Raster à 1 mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale wurden über alle 36 Messpixel aufsummiert. Rechtseitig sind die auf das Maximum normierten Signale dargestellt..... 100

Abb. 5.5-1 Handversuch der Dunkel- und Phototoxizität: Exemplarische Fotos der mit *M. luteus* inkubierten Proben NP, I1nb, A1nb und A2nb. Für die Bestimmung der Phototoxizität wurden je Probe, jeweils vier Textil-Stücke mit $11\text{mW}/\text{cm}^2$ Weißlicht für 1 h bestrahlt. *M. luteus* ist ein gelber Keim und daher auf den ebenso gelben Textilproben schwer zu fotografieren. Die gelbe Farbe auf den Nullproben (ohne Keim weiß) stammt ausschließlich vom *M. luteus*. Probenbezeichnungen: NP (Nullprobe), I1nb (gefärbt im Imprägnierverfahren), A1nb und A2nb (gefärbt im Ausziehverfahren) 104

Abb. 5.5-2 PDI von *E. coli* auf allen sechs funktionalisierten Textilproben sowie der Nullprobe (NP) als Referenz. Die Bestrahlung mit Weißlicht erfolgte für eine Stunde bei $11 \pm 2 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 18 Zählungen ($n=18$). Das Zähllimit ist gestrichelt markiert. Die relative Rate ist auf die dunkel inkubierte Nullprobe normiert. Probenbezeichnungen: I1nb (im Imprägnierverfahren gefärbte nachbehandelte Proben), A1nb und A2nb (im Ausziehverfahren bei unterschiedlichen Temperaturen gefärbte und nachbehandelte Proben) ... 104

Abb. 5.5-3 PDI von *E. coli* auf der im Imprägnierverfahren gefärbten Probe I1nb sowie der Nullprobe (NP) als Referenz nach 5, 10 und 30 min. Die Bestrahlung erfolgte bei $11 \pm 2 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 12 Zählungen ($n=12$). Das Zähllimit ist gestrichelt markiert. Die relative Rate ist auf die dunkel inkubierte Nullprobe normiert. 105

Abb. 5.6-1 Fluoreszenz- und Streulichtaufnahmen der mit Bakteriensuspension ($10\ \mu\text{l}$ mit 10^8 KBE/ml *E. coli* in PBS) inokulierten im Imprägnierverfahren gefärbten Probe I1nb – Anregung bei 405 nm, Emission bei 650 bis 750 nm. Die Aufnahmen erfolgten im gleichen Bildausschnitt unmittelbar nach Inokulation (obere Bildreihe) und 5 bis 10 min später (untere Bildreihen). Die lokalisierten Fluoreszenzspots wurden zur besseren Erkennbarkeit gelb umrandet. 107

Abb. 5.6-2 Links: Relative TMPyP-Emission (600 bis 1000 nm) der Proben I1nb nach bis zu 15-tägiger Bestrahlung im 8h-an-16h-aus-Regime mit $11 \pm 2\ \text{mW/cm}^2$. Die Werte sind auf die erste Messung (0d) normiert, die entsprechenden Fehlerbalken resultieren aus Standardabweichung (36 Messpixel) und Fehlerfortpflanzung. Im überlagerten Foto sind eine unbestrahlte und die zu 40 % ausgebleichene Probe nach 15 Tagen dargestellt. Rechts: NIR-Lumineszenz ($1270 \pm 15\ \text{nm FWHM}$) ebd. Proben nach 0d und 15d. Es wurden 6×6 -Pixel-Raster à 1 mm Schrittweite unter einer Quarzglasscheibe gescannt. Die dargestellten Signale wurden über alle 36 Messpixel aufsummiert..... 108

Publikationen des Autors

Zeitschriftenartikel

MÜLLER, A.; PREUß, A.; POHL, J.; ARMBRUSTER, B.; KOFLER, W.; RÖDER, B. A simple approach to antimicrobial PET-textiles based on photo-dynamic inactivation. In Vorbereitung für *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2020**.

MÜLLER, A.; PREUß, A.; BORNHÜTTER, T.; THOMAS, I.; PRAGER, A.; SCHULZE, A.; RÖDER, B. Electron bean functionalized photodynamic polyethersulfone membranes – photophysical characterization and antimicrobial activity. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2018**, 17, 1346-1354.

MÜLLER, A.; PREUß, A.; RÖDER, B. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* – Correlation of singlet oxygen kinetics and phototoxicity. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, **2018**, 178, 219-227.

GEORGE, L.; MÜLLER, A.; RÖDER, B.; SANTALA, V.; EFIMOV, A. Photodynamic self-desinfecting surface using pyridinium phthalocyanine. *Dyes and Pigments*, **2017**, 147, 334-342.

SOLL, M.; SUDHAKAR, K.; FRIDMAN, N.; MÜLLER, A.; RÖDER, B.; GROSS, Z. One-Pot Conversion of Fluorophores to Phosphorophores. *Organic Letters*, **2016**, 18, 5840-5843.

WINTER, L.; ÖZERDEM, C.; HOFFMANN, W.; SANTORO, D.; MÜLLER, A.; WAICZIES, H.; SEEMANN, R.; GRAESSL, A.; WUST, P.; NIENDORF, T. Design and Evaluation of a Hybrid Radiofrequency Applicator for Magnetic Resonance Imaging and RF Induced Hyperthermia: Electromagnetic Field Simulations up to 14.0 Tesla and Proof-of-Concept at 7.0 Tesla. *PLoS ONE*, **2013**, 8, e61661

SANTORO, D.; WINTER, L.; MÜLLER, A.; VOGT, J.; RENZ, W.; ÖZERDEM, C.; GRÄSSL, A.; TKACHENKO, V.; SCHULZ-MENGER, J.; NIENDORF, T. Detailing Radio Frequency Heating Induced by Coronary Stents: A 7.0 Tesla Magnetic Resonance Study. *PLoS ONE*, **2012**, 7, e49963

Konferenzen und eingeladene Vorträge (als Vortragender)

MÜLLER, A.; PREUß, A.; RÖDER, B. Electron Beam Functionalized Microfiltration Membranes for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Third Sino-German Symposium on Singlet Molecular Oxygen and Photodynamic Effects*, **2019**, Fuzhou (China).

MÜLLER, A.; PREUß, A.; RÖDER, B. Photodynamic Inactivation of Microorganisms via Functionalized Microfiltration Membranes. *Tenth International Conference on Porphyrins & Phthalocyanines ICPP-10*, **2018**, München (Deutschland).

MÜLLER, A.; RÖDER, B. PDI of microorganisms via functionalized microfiltration membranes. *Second Sino-German Symposium on Singlet Molecular Oxygen and Photodynamic Effects*, **2017**, Berlin (Deutschland).

MÜLLER, A.; PREUß, A.; RÖDER, B. Photodynamic Inactivation of Multi-Resistant Gram-Negative Bacteria: Experimental Requirements and Methods. *Kolloquium der AG Química Orgânica der Universität von Aveiro*, **2013**, Aveiro (Portugal).

MÜLLER, A. Radiofrequenz-induzierte Erwärmung an Koronarstents bei 7 Tesla. *Kolloquium der Berlin Ultrahigh Field Facility (B.U.F.F.) am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin*, **2012**, Berlin (Deutschland).

Danksagung

Zunächst möchte ich meinen herzlichen Dank an Prof. Beate Röder richten – ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Weit darüber hinaus danke ich ihr für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die es mir ermöglicht hat einen Beitrag zum spannenden und gesellschaftlich relevanten Themenkomplex antimikrobieller Alternativen beizusteuern, ihr langjähriges Vertrauen und die Betreuung meiner Master- und Promotionsarbeit, die ich in dieser Form nur jedem Studenten und jeder Studentin wünschen kann. Die Möglichkeit einen Beitrag zu Konferenzen, Vorträgen, Publikationen, studentischen Qualifizierungsarbeiten und Industrieprojekten zu leisten, hat mich wesentlich in meiner Entwicklung geprägt.

Ich möchte mich bei der gesamten AG PBP, vor allem Grete, Tobi, Micha, Jakob, Steffen, Marek, Ronald, Eugeny und André, für das großartige und sehr kollegiale Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt Annegret Preuß, die mich als Mentorin und Bezugsperson seit meiner Masterarbeitszeit in der AG PBP begleitet hat. Ihr, Steffen Hackbarth und Jakob Pohl möchte ich auch für das Korrektorat dieser Arbeit danken. Ebenfalls hervorheben möchte ich Tobias Bornhütter, ohne dessen Entwicklung des Scanmessplatzes die Arbeit in dieser Form nicht denkbar gewesen wäre.

Den Kooperationspartnern – insbesondere Birgit Armbruster, Agnes Schulze, Isabell Thomas und Delara Hartmann – möchte ich für die Bereitstellung der Proben und die sehr konstruktive Zusammenarbeit danken. Der Familie Ortner und ihrem Mitarbeiter Wolfram Kofler, die im Rahmen des HEPS-Projektes das Thema der funktionalisierten Textilien mit angestoßen haben, gilt ebenfalls besonderer Dank.

Ich danke dem Land Berlin und der HUB für die finanzielle Förderung meiner Promotion im Rahmen des Elsa-Neumann-Stipendiums und des Research-Track Übergangsstipendiums.

Vielen Dank an Alexandra Glück, Michal Gora, Marc Kitzmann und Georg Klinghammer, die im Rahmen ihrer Qualifizierungsarbeiten das vorliegende Thema vorangebracht haben. Hervorheben möchte ich Alexandra Glück, die einen wichtigen Beitrag zu Zellversuchen, der Fehlerabschätzung des Scan-Messplatzes und fachlichen Diskussionen geleistet hat.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen bedanken. Ihr seid mein Hafen.

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß §7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad im Promotionsfach Physik beworben und besitze keinen Doktorgrad im Promotionsfach Physik.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, den 29. Januar 2020